



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA NANOENCAPSULACIÓN DE UN FLAVONOIDE
(PINOCEMBRINA) EN LIPOSOMAS DE DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA (DPPC)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

PAMELA ELIZALDE DOMINGUEZ



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS

VOCAL: Profesor: NELLY NORMA CASTRO TORRES

SECRETARIO: Profesor: FERNANDO MORALES MORALES

1er. SUPLENTE: Profesor: ERNESTO CARRILLO NAVA

2° SUPLENTE: Profesor: ABEL SANCHEZ BEJARANO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 302, BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. ELIZABETH URÍA CANSECO

SUSTENTANTE:

Pamela Elizalde Dominguez

Agradecimientos

El siguiente trabajo fue realizado gracias a:

La Facultad de Química. Proyecto PAIP 5000-9020.

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

El préstamo del equipo Nanosizer. ZS ZEN (3600) de la Dra. Josefa Bernard Bernard del cubículo 123 de Sistemas de Liberación de Fármacos en el Edificio F de la Facultad de Química.

La obtención de microscopías de barrido y transmisión por el Dr. Rafael Iván Puente Lee de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) en el Edificio Mario Molina.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Definición del proyecto	1
1.2 Objetivos generales	2
1.3 Objetivos particulares.....	2
1.4 Hipótesis.....	3
2. Antecedentes	4
2.1 Flavonoides	4
2.2 Pinocembrina.....	6
2.3 Fosfolipidos.....	7
2.4 Liposomas	8
2.5 Clasificación de liposomas	9
2.6 Técnicas de obtención de liposomas	10
2.7 Efecto de la presencia del colesterol en los liposomas	11
3. Fundamentos de técnicas experimentales.	13
3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	13
3.1.1 Perfiles de transición	19
3.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	24
3.2.1 Tamaño de partícula	24
3.2.2 Potencial Z.....	29
3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	33
3.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	35
3.5 Espectrofotometría de UV-Visible	38
3.5.1 Eficiencia de encapsulación	40
4. Desarrollo experimental	41
4.1 Reactivos	41
4.2 Equipos.....	42
4.3 Preparación de suspensiones liposomales de DPPC, DPPC:PINO, DPPC:CHOL y DPPC:PINO:CHOL.	43

4.4 Caracterización termodinámica de los sistemas liposomales por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	45
4.5 Determinación de estabilidad de los sistemas liposomales por técnicas dispersivas de luz (DLS).....	46
4.5.1 Tamaño de partícula.	46
4.5.2 Potencial Z.....	47
4.6 Determinación de morfología de los liposomas por técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM).	47
4.7 Determinación de morfología de los liposomas por técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	48
4.8 Caracterización termodinámica de la determinación de concentración de saturación de la bicapa lipídica.	48
4.9 Determinación de la eficiencia de encapsulación de pinocembrina en liposomas de DPPC.	49
4.9.1 Curva patrón de pinocembrina en etanol.....	49
4.9.2 Método de centrifugación para determinar %EE.	50
4.9.3 Método de precipitación de liposomas con un agente coagulante (protamina) para determinar %EE	51
4.9.4 Método con filtros Amicon® Ultra para determinar %EE ..	52
5. Resultados y Discusión	54
5.1 Sistema liposomal de DPPC.....	54
5.1.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC.....	54
5.1.2 Dispersión dinámica de la Luz de DPPC. Tamaño de partícula y Potencial Z.....	56
5.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC.....	59
5.2 Sistema liposomal de DPPC: CHOL.	60
5.2.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC: CHOL.	60
5.2.2 Dispersión dinámica de la Luz de DPPC: CHOL. Tamaño de partícula y Potencial Z.....	63
5.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC: CHOL.....	65
5.3 Sistema liposomal de DPPC: PINO.....	66

5.3.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC: PINO.	66
5.3.2 Dispersión dinámica de la Luz de DPPC: PINO. Tamaño de partícula y Potencial Z	71
5.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC: PINO.....	72
5.4 Sistema liposomal DPPC: PINO: CHOL.....	73
5.4.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC: PINO: CHOL.....	73
5.4.2 Dispersión dinámica de la luz de DPPC: PINO: CHOL. Tamaño de partícula y Potencial Z.....	74
5.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC: PINO: CHOL.....	77
5.5 Determinación de la concentración de saturación de la bicapa lipídica con la incorporación de pinocembrina.	78
5.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación de pinocembrina en liposomas de DPPC por espectrofotometría de UV-Visible.....	82
5.6.1 Curva patrón de pinocembrina en etanol.....	82
5.6.2 Método de centrifugación para determinar %EE.	84
5.6.3 Método de precipitación de liposomas con un agente coagulante (protamina) para determinar %EE.....	87
5.6.4 Método con filtros Amicon ® Ultra para determinar %EE	91
6. Conclusiones	93
7. Referencias	94

Lista de figuras

Figura 2.1 Estructura básica del esqueleto flavonólico	4
Figura 2.2 Las principales clases de flavonoides y compuestos relacionados.	5
Figura 2.3 Estructura química de la pinocembrina.....	7
Figura 2.4 Estructura de L-alfa-dipalmitoílfosfatidilcolina	8
Figura 2.5 Molécula anfífilica (a), Formación de la bicapa (b), Liposoma (c)	9
Figura 2.6 Clasificación de liposomas basados en el tamaño y lamelaridad.....	10
Figura 2.7 Estructura química del colesterol	12
Figura 3.1 Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) y desgasificador utilizado en la parte experimental.	14
Figura 3.2 Representación esquemática del termograma de fusión (a 40 ° C, dato de DPPC). A describe la dependencia de la diferencia de entalpía de la temperatura. B es la dependencia de la temperatura de C_p	16
Figura 3.3 Termograma del liposoma DPPC obtenido en este trabajo	17
Figura 3.4 Perfil de transición de fase tipo A↓	20
Figura 3.5 Perfil de transición de fase tipo C↓	21
Figura 3.6 Perfil de transición de fase tipo B↓.....	22
Figura 3.7 Perfil de transición de fase tipo D↑	22
Figura 3.8 Diagrama esquemático (no dibujado a escala) que ilustra las diversas características del empaquetamiento intermolecular dentro de una fase de la bicapa	23
Figura 3.9 Fenómeno físico de dispersión debido a la interacción radiación-materia	25
Figura 3.10 Patrón de manchas obtenidas por el fenómeno de dispersión de luz.....	25
Figura 3.11 Fluctuaciones de luz dispersada incidiendo en el detector	26
Figura 3.12 Intensidad típica de las fluctuaciones de las partículas grandes y pequeñas. 26	
Figura 3.13 Resultados de un número de distribución, con dos señales del mismo tamaño, ya que hay igual número de partículas.....	27
Figura 3.14 Resultado por volumen de distribución	28
Figura 3.15 Resultado por intensidad.....	28
Figura 3.16 Esquema del sistema interno del DLS (izquierda) y DLS NANOSIZER ZS ZEN (3600) utilizado en el experimento (derecha).	29
Figura 3.17 Distorsión del campo eléctrico aplicado sobre una partícula coloidal. a) para dobles capas finas, $kD \gg 1$ o $a \gg 1$, existe una mayor proporción de iones de electrolito que experimentan un campo distorsionado. b) para dobles capas gruesas, $kDa \ll 1$ o a	

<<1, existe una mayor proporción de iones de polielectrolito que experimentan el campo original sin distorsionar.....	31
Figura 3.18 Celda de medida y esquema del proceso de medida por LDV. Representación del movimiento de los iones hacia los electrodos en la célula cuando se aplica un potencial, donde la velocidad de los iones es la velocidad electroforética.	33
Figura 3.19 Microscopio Electrónico multifuncional JEOL JSM-5900-LV.	34
Figura 3.20 Microscopio electrónico de transmisión multifuncional JEOL JEM-2010, resolución: 0.14 nm, amplificación: 3000-1500k.....	35
Figura 3.21 Esquema de un espectrofotómetro..	39
Figura 3.22 Pérdidas por reflexión y dispersión..	40
Figura 4.1 Método de hidratación de película delgada y métodos de reducción de tamaño (Araújo Lopes et al., 2013).....	44
Figura 5.1 Termograma del liposoma DPPC.....	54
Figura 5.2 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC del día 1 al día 20	57
Figura 5.3 Gráfica de medición de tamaño de partícula del sistema liposomal DPPC.....	58
Figura 5.4 Gráfica de potencial Z (mV) del sistema liposomal DPPC.....	58
Figura 5.5 Microscopia electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC.....	59
Figura 5.6 Termograma DSC del sistema DPPC: CHOL.....	60
Figura 5.7 Termograma DSC del sistema DPPC: CHOL. (Línea sólida). Curvas deconvolucionadas (líneas punteadas).....	61
Figura 5.8 Representación de dominios de CHOL para la fase gel y la fase cristal-líquido (Martínez 2016)	62
Figura 5.9 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: CHOL del día 1 al día 15.....	63
Figura 5.10 Gráfica de variación del tamaño de partícula en función del tiempo del sistema DPPC:CHOL.....	64
Figura 5.11 Distribución gaussiana de potencial Z en mV del sistema liposomal DPPC: CHOL.....	65
Figura 5.12 Microscopia electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC: CHOL.....	65
Figura 5.13 Termograma DSC de los sistemas DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B.66	
Figura 5.14 Termograma DSC del sistema DPPC: PINO A y DPPC: PINO B.....	68
Figura 5.15 En a) se muestra el liposoma de DPPC: PINO A y en b) el liposoma de DPPC: PINO B.....	69

Figura 5.16 Termograma DSC del sistema DPPC: PINO A (a) y DPPC: PINO B (b) (Líneas solidas). Curvas deconvolucionadas (líneas punteadas).....	70
Figura 5.17 Gráficas de distribución gaussiana de tamaño vs intensidad del sistema liposomal de DPPC: PINO a lo largo de 5 días.	71
Figura 5.18 Gráfica de medición de tamaño del sistema liposomal DPPC: PINO.....	72
Figura 5.19 Microscopia electrónica de barrido SEM(a,b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC:PINO.....	73
Figura 5.20 Termograma DSC del sistema DPPC: PINO: CHOL.....	74
Figura 5.21 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 1....	74
Figura 5.22 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 5....	75
Figura 5.23 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 10.....	75
Figura 5.24 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 15.....	75
Figura 5.25 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 20.....	76
Figura 5.26 Gráfica de tamaño de partícula del sistema liposomal DPPC:PINO:CHOL...	76
Figura 5.27 Microscopia electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC: PINO: CHOL.....	77
Figura 5.28 Termograma de los sistemas liposomales con diferentes concentraciones de pinocembrina caracterizados por DSC.....	79
Figura 5.29 Variación del T_m de transición y $T_{1/2}$, conforme aumenta la concentración de pinocembrina en el sistema liposomal de DPPC (~10 mM).....	80
Figura 5.30 Variación del ΔH° de transición, conforme aumenta la concentración de pinocembrina en el sistema liposomal de DPPC (~10 mM).....	81
Figura 5.31 Variación del tamaño de partícula, conforme aumenta la concentración de pinocembrina en el sistema liposomal de DPPC (~10 mM).....	82
Figura 5.32 Absorbancias obtenidas de diferentes concentraciones de PINO en etanol..	83
Figura 5.33 Curva patrón de pinocembrina en etanol.....	84
Figura 5.34 Absorbancias obtenidas después de 2, 4:30 y 7 horas de centrifugación de DPPC: PINO.....	86
Figura 5.35 Precipitación de liposomas con protamina.....	88
Figura 5.36 Absorbancias obtenidas al agregar diferentes volúmenes de protamina al sistema liposomal de DPPC:PINO.....	89

Figura 5.37 Absorbancia de pinocembrina no encapsulada en el sistema liposomal, DPPC: PINO 1, DPPC: PINO 2 y DPPC: PINO 3 por el método de protamina.....	90
Figura 5.38 Filtros Amicon® Ultra.....	91
Figura 5.39 Absorbancia de pinocembrina no encapsulada en el sistema liposomal, DPPC: PINO 4, DPPC: PINO 5 y DPPC: PINO: CHOL 2 con filtros Amicon® Ultra.....	92

Lista de tablas

Tabla 2.1 Clasificación de liposomas..	9
Tabla 4.1 Concentración de los diferentes componentes de los sistemas estudiados.....	43
Tabla 4.2 Concentraciones reales utilizadas para los diferentes sistemas liposomales para determinar la concentración de saturación de la membrana... ..	49
Tabla 4.3 Volúmenes medidos para la curva patrón	50
Tabla 5.1 Resultados termodinámicos de los liposomas de DPPC caracterizado por DSC.....	54
Tabla 5.2 Datos termodinámicos de la literatura del liposoma de DPPC.....	55
Tabla 5.3 Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC..	57
Tabla 5.4 Resultado de potencial Z del sistema liposomal DPPC..	59
Tabla 5.5 Resultados termodinámicos de los liposomas de DPPC: CHOL caracterizado por DSC.....	60
Tabla 5.6 Resultados termodinámicos de deconvolución de los liposomas de DPPC:CHOL caracterizado por DSC.....	62
Tabla 5.7 Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC: CHOL.....	64
Tabla 5.8 Resultados de parámetros termodinámicos de los liposomas de DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B caracterizado por DSC... ..	66
Tabla 5.9 Resultados termodinámicos de deconvolución de los liposomas de DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B caracterizado por DSC.....	68
Tabla 5.10 Resultados de ΔH° y ΔS° de cada pico obtenido de la deconvolución de los sistemas liposomales DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B.....	70
Tabla 5.11 Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC: PINO.....	72
Tabla 5.12 Resultados de los parámetros termodinámicos de los liposomas de DPPC: CHOL: PINO caracterizado por DSC... ..	74
Tabla 5.13 Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC: CHOL:PINO.....	76
Tabla 5.14 Resultados termodinámicos de los sistemas liposomales con diferentes concentraciones de pinocembrina caracterizados por DSC... ..	79
Tabla 5.15 Concentraciones y absorbancias de PINO para la formación de la curva patrón de pinocembrina en etanol.....	83
Tabla 5.16 Imágenes de las fracciones después de 2, 4:30 y 7 horas de centrifugación del sistema liposomal de DPPC: PINO.....	86
Tabla 5.17 %EE de los dos ensayos realizados por centrifugación.....	86
Tabla 5.18 %EE de PINO en sistemas liposomales por el método de centrifugación.....	87
Tabla 5.19 %EE de PINO en sistemas liposomales precipitados con Protamina... ..	90

Abreviaturas

DPPC.....	Dipalmitoilfosfatidilcolina.
PINO.....	Pinocembrina.
CHOL.....	Colesterol.
SEM.....	Microscopía electrónica de barrido (siglas en inglés).
TEM.....	Microscopía electrónica de transmisión (siglas en inglés).
DSC.....	Calorimetría diferencial de barrido (siglas en inglés).
DLS.....	Dispersión dinámica de luz (siglas en inglés).
T _m	Temperatura principal de transición.
T _p	Temperatura de pre-transición.
ΔH.....	Entalpía.
ΔS.....	Entropía.
SUV.....	Small unilamellar vesicles.
LUV.....	Large unilamellar vesicles.
GUV.....	Giant unilamellar vesicles.
OLV.....	Oligolamellar vesicles.
MLV.....	Multilamellar vesicles.
LDE.....	Electroforesis Láser Doppler (siglas en inglés).
SE.....	Electrones secundarios (siglas en inglés).
BSE.....	Electrones retrodispersados (siglas en inglés).
T.....	Transmitancia.
A.....	Absorbancia.
P _o , P.....	Potencia radiante.
%EE.....	Eficiencia de encapsulación.

1. Introducción.

1.1 Definición del proyecto.

La pinocembrina (5,7-dihydroxiflavonona, $C_{15}H_{12}O_4$) es un flavonoide abundante en la miel, propóleo y en algunas otras especies de plantas; esta molécula ha demostrado tener actividad biológica como antioxidante, antifúngico, antibacterial, antiinflamatorio y anticancerígeno. A pesar de su gran potencial en formulaciones farmacéuticas, el uso de la pinocembrina está limitado debido a su baja solubilidad.

En esta investigación, uno de los principales objetivos es diseñar nanoacarreadores biocompatibles, como son los liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), de pinocembrina, estables y biodisponibles para potencializar sus aplicaciones terapéuticas.

Se prepararon liposomas de DPPC, DPPC con colesterol, DPPC con pinocembrina y DPPC con colesterol y pinocembrina para identificar cuál de los sistemas resulta más estable y más viable para su utilización como sistema acarreador. El colesterol fue utilizado para proporcionar más estabilidad a la membrana formada. También se estudió la eficiencia de encapsulación en los sistemas liposomales propuestos.

Las propiedades de los sistemas liposomales fueron estudiadas por medio de técnicas, como son: calorimetría diferencial de barrido (DSC), dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La eficiencia de encapsulación fue estudiada con la técnica de espectrometría de UV-Visible.

1.2 Objetivos generales.

- Diseñar un sistema nanoacarreador estable que permita incorporar la pinocembrina a la bicapa lipídica formada por dipalmitoilfosfatidilcolina(DPPC).
- Determinar los parámetros fisicoquímicos de la nanoencapsulación de la pinocembrina en un liposoma de dipalmitoilfosfatidilcolina(DPPC).

1.3 Objetivos Particulares.

- ✓ Preparar liposomas de DPPC, DPPC: CHOL, DPPC: PINO y DPPC:CHOL:PINO.
- ✓ Determinar los parámetros termodinámicos de los liposomas, como son ΔH , ΔS , $T_{1/2}$ y T_m por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).
- ✓ Determinar el tamaño de partícula y potencial Z de los liposomas formados, por técnicas dispersivas de luz.
- ✓ Determinar la morfología y lamelaridad de los liposomas elaborados por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).
- ✓ Determinar el porcentaje de saturación de la bicapa lipídica
- ✓ Determinar la eficiencia de encapsulación de la pinocembrina en DPPC por medio de espectrometría de UV-Visible.

La pinocembrina es una sustancia hidrófoba. Los fosfolípidos forman estructuras llamadas liposomas, que son biocompatibles y que pueden alojar en su interior tanto sustancias hidrófobas como hidrófilas. La adición de colesterol al sistema liposomal aumenta la estabilidad y hidrofobicidad de la bicapa lipídica. Basados en estos antecedentes se plantea la siguiente.

1.4 Hipótesis.

La disponibilidad y la estabilidad del sistema liposomal formado por pinocembrina, colesterol y DPPC mejorarán.

2. Antecedentes.

2.1 Flavonoides.

Los flavonoides son moléculas de origen natural derivados de una clase de benzo- γ -pirona, distribuidos ampliamente entre las plantas. Las diferencias individuales dentro de cada subclase se determinan por la variación en número y disposición de los grupos hidroxilo, así como por la naturaleza y extensión de alquilación. Los flavonoides tienen múltiples actividades biológicas incluyendo las acciones potentes anti-alérgicas, anti-inflamatorias y antivirales. [1]

Químicamente los flavonoides son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general $C_6-C_3-C_6$, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (Figura 2.1). [2]

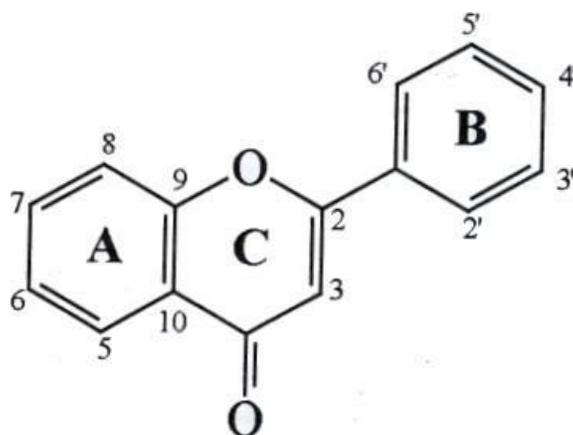


Figura 2.1 Estructura básica del esqueleto flavonólico.

Los anillos son denominados A, B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números con apóstrofe para el anillo B. Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glucósidos, aunque también se presentan

con relativa frecuencia como agliconas libres [3]. En la figura 2.2 se presentan las principales clases de flavonoides y compuestos relacionados, en donde se pueden encontrar las flavononas que son coloridas, por ejemplo; la pinocembrina, compuesto de interés en este trabajo.

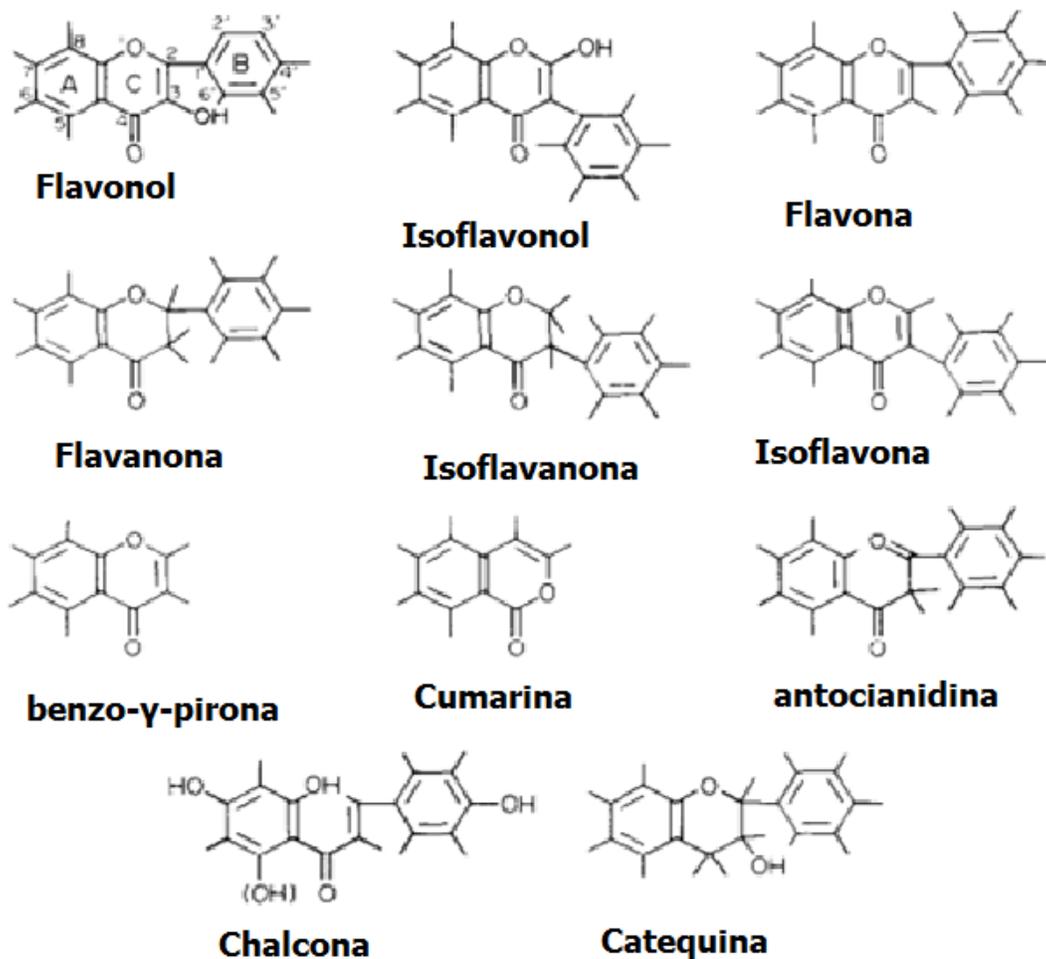


Figura 2.2. Las principales clases de flavonoides y compuestos relacionados. [4]

2.2 Pinocebrina.

La pinocebrina, también llamada 5,7-dihidroxi flavonona, $C_{15}H_{12}O_4$ (figura 2.3) con masa molar pequeña, es uno de los fitoquímicos principales entre los flavonoides. [5]

Estudios anteriores revelaron que la pinocebrina puede ser extraída de diferentes fuentes naturales como algunas plantas, la miel y del propóleo, aunque esta obtención se ve obstaculizada por la baja disponibilidad y por los complicados procedimientos de purificación. También puede ser sintetizada químicamente, sin embargo, la síntesis química también se obstaculiza por el uso de productos químicos tóxicos, condiciones de reacción extrema y una resolución enantiomérica sofisticada. Se ha optado también por la producción microbiana, para mejorar los rendimientos de una manera más económica y respetuosa por el medio ambiente, por la ingeniería metabólica o la biología sintética. [6]

La pinocebrina tiene una variedad de efectos biológicos que han sido bien investigados con anterioridad, los cuales pueden ser antitumoral, antimicrobiano, antiinflamatorio, tiene propiedades antifúngicas, ejerce actividad anticancerígena y acción antioxidante. El diseño de nuevos medicamentos basados en estos efectos puede ser beneficioso, ya que la pinocebrina ha demostrado ser un candidato farmacológico potencialmente prometedor, su uso está limitado debido a su baja solubilidad. En esta investigación, uno de los principales objetivos es diseñar nanoacarreadores biocompatibles, como son los liposomas de DPPC, de pinocebrina, estables y biodisponibles para potencializar sus aplicaciones terapéuticas. [7-9]

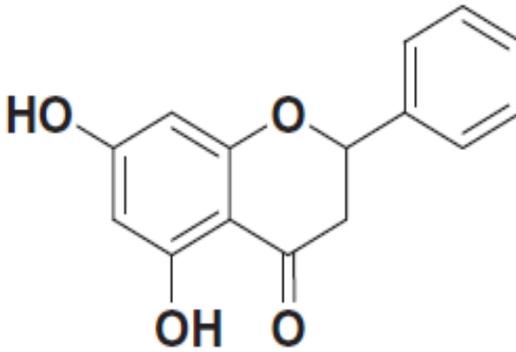


Figura 2.3 Estructura química de la pinocembrina.

2.3 Fosfolípidos.

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

Las fosfatidilcolinas son fosfolípidos derivados de ácidos grasos de cadena larga, compuestos por dos cadenas de acilo y un componente de glicerol que une a las dos cadenas con una cabeza polar de fosforilcolina, las cuales se diferencian por el número de carbonos que pueden ir de 12 a 18 carbonos dependiendo del ácido graso del que provienen, por ejemplo Dimiristoílfosfatidilcolina (14 C), Dipalmitoílfosfatidilcolina (16 C) utilizado en esta investigación (figura 2.4) y Diestearoílfosfatidilcolina (18 C). Las fosfatidilcolinas son un producto de separación de la lecitina, que es una mezcla de lípidos saponificables derivada de tejidos animales y vegetales. [10-11]

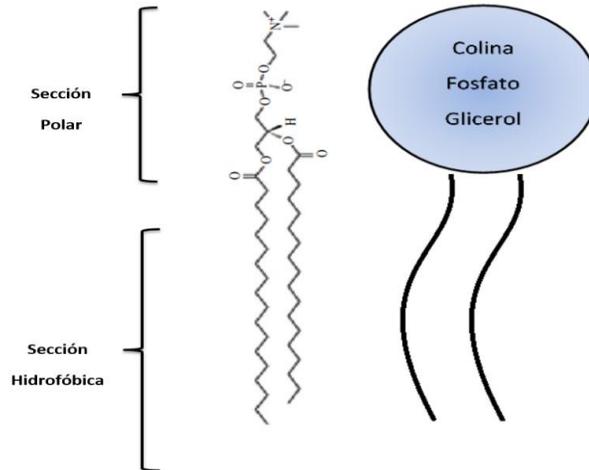


Figura 2.4. Estructura de L-alfa-dipalmitoilfosfatidilcolina. [12]

Los fosfolípidos pueden clasificarse según la carga de la cabeza polar como aniónicos que tiene cabeza polar cargada negativamente, catiónicos con cabeza polar cargada positivamente, zwitteriónicos en los cuales pueden tener la cabeza polar tanto cargada negativamente como positivamente dependiendo del medio y los no iónicos donde la cabeza polar no tiene carga.

2.4 Liposomas.

Los liposomas se consideran modelos de gran importancia para el estudio de membranas biológicas. Debido a que tienen muchas propiedades fisicoquímicas similares a las membranas celulares, tales como la permeabilidad de la membrana, la actividad osmótica, la interacción con varios solutos, las características de la superficie y la composición química. La fluidez de sus membranas y su estructura auto-cerrada son parámetros esenciales para el estudio de la membrana biológica. [13]

Los liposomas (figura 2.5) son sistemas vesiculares constituidos por moléculas anfifílicas (normalmente fosfolípidos) que forman una doble capa mediante un autoensamblaje que orienta la fracción polar de las moléculas hacia el medio acuoso interno y externo de la estructura. Debido al orden que adquiere el

liposoma, éstos adoptan una forma esferoide, que posee una región liposoluble en el interior de la membrana y regiones hidrosolubles en el interior y exterior del liposoma, pueden estar formadas por una o más bicapas o lamelas de fosfolípidos. Debido a la estructura y orientación de los liposomas, estos adquieren la capacidad de encapsular fármacos de carácter hidrofóbico en la doble capa de fosfolípidos. Los liposomas, también tienen afinidad por aquellos fármacos de carácter hidrofílico, pues presentan un interior acuoso dentro del cual se almacena el fármaco hidrosoluble [14].

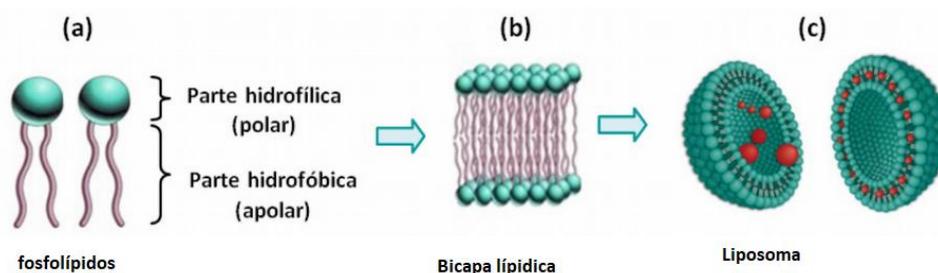


Figura 2.5. Molécula anfifílica (a), Formación de la bicapa (b), Liposoma (c). [14]

2.5 Clasificación de liposomas.

Los liposomas pueden ser clasificados basándose en el método de preparación, por el número de bicapas presentes en la vesícula o por el tamaño (figura 2.6). Siendo estos últimos la clasificación más empleada. Los liposomas son clasificados como:

Tabla 2.1. Clasificación de liposomas.

Clasificación	Tamaño de partícula aproximado
SUV (Small unilamellar vesicles)*	20-100 nm
LUV (Large unilamellar vesicles)*	>100 nm
GUV (Giant unilamellar vesicles)*	>1000 nm
OLV (Oligolamellar vesicle)*	100-500 nm
MLV (Multilamellar vesicles)*	>500 nm

*Siglas y nombres en inglés

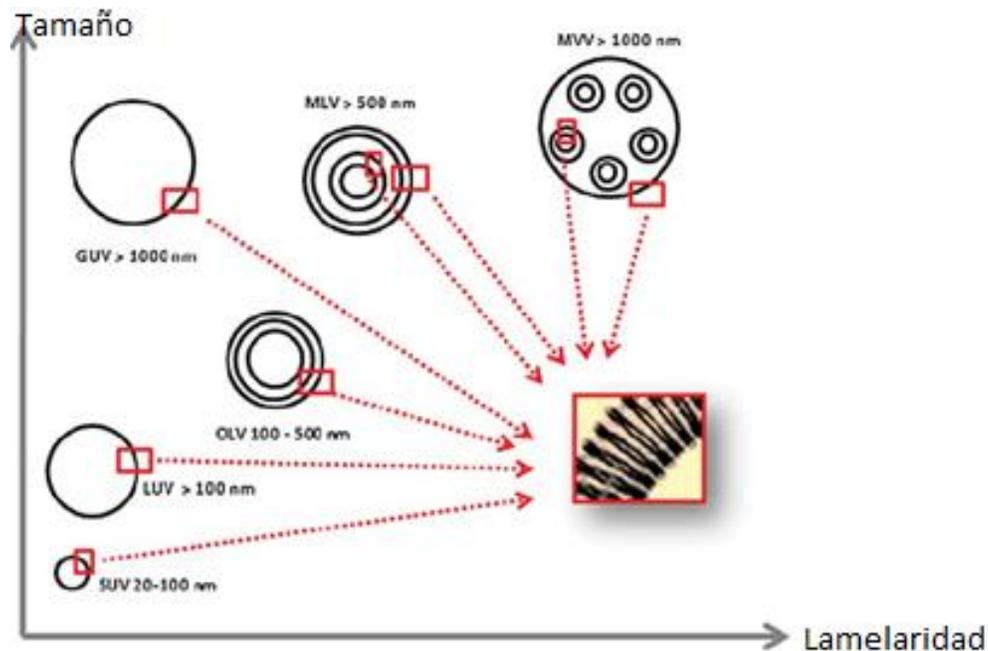


Figura 2.6 Clasificación de liposomas basados en el tamaño y lamelaridad. [14]

2.6 Técnicas de obtención de liposomas.

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

(a) Métodos a granel, donde los liposomas se obtienen por transferencia de fosfolípidos de una fase orgánica a una fase acuosa.

(b) Métodos de película, en cuyas películas lipídicas se depositan primero sobre un substrato y luego se hidratan para dar liposomas.

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

Para aplicaciones de administración de fármacos, el tamaño deseado de liposomas oscila entre 40 y 200 nm. La distribución del tamaño de las vesículas es un factor crucial para determinar la eficacia de la administración de fármacos. La acumulación de liposomas en los tumores depende del tamaño, ya que los

capilares del tumor tienen poros más grandes (de 100 a 700 nm de diámetro) que los vasos sanguíneos normales (típicamente <50 nm). Por lo tanto, los liposomas entre 90 y 200 nm de diámetro pueden penetrar selectivamente los capilares del tumor. El perfil de liberación del fármaco de los liposomas *in vivo* también se ha demostrado que es dependiente del tamaño. Para la administración de fármacos liposómicos inhalados, el tamaño ideal de los liposomas es de 1 a 3 μm , porque las partículas de este rango de tamaño pueden administrarse al pulmón profundo de forma más eficaz y evitar el aclaramiento fagocítico de la periferia pulmonar. Por lo tanto, la reducción del tamaño y la lamellaridad de los liposomas se lleva a cabo típicamente sometiendo a ciclos de homogeneización, sonicación, extrusión o congelación-descongelación. [16-17]

2.7 Efecto de la presencia del colesterol en los liposomas

En el presente trabajo se formaron liposomas DPPC con colesterol, debido a que es una biomolécula vital y desempeña un papel importante en la fluidez de las membranas mediante la regulación de sus funciones. El colesterol encaja su parte no polar entre las cadenas alquílicas de los fosfolípidos, causando el desorden del empaque de la bicapa lipídica. Los efectos térmicos del colesterol dependen de la concentración utilizada. Se ha estudiado la interacción del colesterol con bicapas lipídicas de DPPC y otra variedad de fosfolípidos, donde los resultados revelaron que a una concentración de más del 15 %, hay una disminución de la transición de fase principal (T_m) y la ampliación del pico, lo que por lo regular conduce a la disminución de la entalpía (ΔH). También se observó la eliminación de la temperatura de pretransición (T_p). A concentraciones aproximadas a 30 % se reveló una fase líquida ordenada, en la que existe un alto grado de ordenamiento conformacional relacionado con cadenas de acilo. Se ha supuesto que el colesterol proporciona efectos de estabilización y rigidez en la bicapa lipídica, lo que afecta las características físicas y su comportamiento fisiológico. Los efectos de estabilización del colesterol en las membranas lipídicas surgen del aumento en la cohesión de los lípidos y el cambio de fase gel a fase fluida. El colesterol es una

molécula responsable de alterar el empaquetamiento de los fosfolípidos, dando lugar a la presencia de dos transiciones superpuestas, una aguda y otra amplia, asociadas a la separación de fase lateral en dominios pobres en colesterol y dominios ricos en colesterol respectivamente. [18]

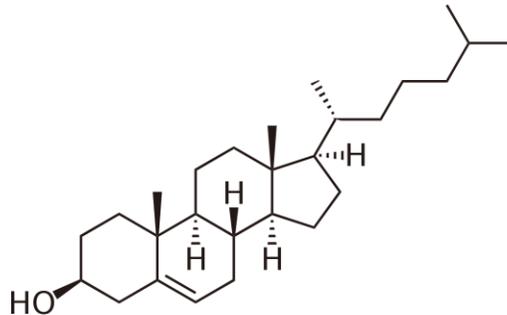


Figura 2.7 Estructura química del colesterol.

Algunos de los principales efectos de la incorporación de colesterol observados en algunos estudios son: (i) una ampliación y eventual desaparición de la transición de la fase gel cooperativo a la fase líquido-cristalino de la bicapa de fosfolípidos, (ii) un aumento o disminución marcado en el orden de orientación de las cadenas hidrocarbonadas de fosfolípidos, por lo tanto, una transición de fase por encima o por debajo de la T_m inicial, (iii) una disminución en el ángulo de inclinación de la cadena de acilo fosfolípido en la fase de gel, y (iv) la eliminación de la pretransición de fosfolípidos a contenidos bajos de colesterol. Además, el colesterol puede disminuir o aumentar la permeabilidad pasiva de las bicapas de fosfolípidos en estado líquido-cristalino o gel y condensar o expandir el estado de las monocapas de fosfolípidos, y también altera las propiedades mecánicas de las bicapas de fosfolípidos. A pesar de este impresionante conjunto de datos experimentales, la comprensión de la base molecular de las interacciones colesterol / fosfolípido sigue siendo incompleta. [19]

3 Fundamentos de técnicas experimentales.

3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés, Differential Scanning Calorimetry) es la técnica más frecuente que se utiliza para determinar los efectos térmicos de una gran variedad de materiales, donde se incluyen los sistemas biológicos relevantes que se caracterizan por un cambio de entalpía en un rango de temperatura. La DSC involucra aplicaciones como: i) caracterización térmica de procesos complejos, como la desnaturalización de proteínas; ii) transición vítrea de polímeros; y iii) determinación del efecto de hidratación, pH, solvente y tipo de composición, en la transición de fase, de los cambios de entalpías de las membranas lipídicas modelos y las bicapas de fosfolípidos, que son componentes para desarrollar portadores de fármacos como son los liposomas.

La DSC proporciona información precisa, rápida y fácil, sobre las propiedades físicas y energéticas de un material. La DSC mide la diferencia entre los flujos de calor a una muestra y una referencia al cambiar la temperatura, a presión atmosférica constante. En la figura 3.1 se muestra el Calorímetro Diferencial de Barrido Marca MicroCal® Incorporated. Modelo VP_DSC Microcalometer y un desgasificador. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo TermoVac2, utilizados en la parte experimental de este trabajo.

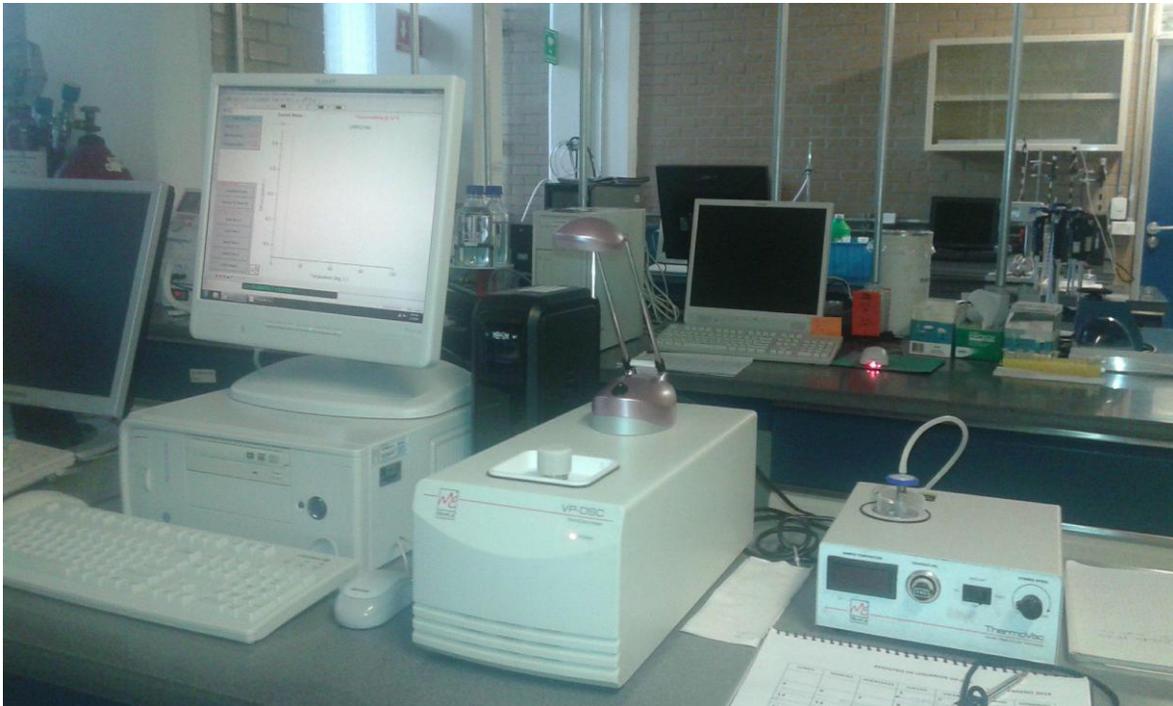


Figura 3.1 Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) y degasificador utilizado en la parte experimental.

Un sistema tenderá a poblar más altos estados de energía cuando la temperatura de cualquier material aumente. Este cambio en la distribución del estado de energía puede ocurrir de una manera bastante drástica, o sea, en un rango de temperatura muy estrecho si el sistema se somete a un cambio que sea altamente cooperativo; característica común de las transiciones de estado.

Si suponemos que el sistema de interés puede existir en cualquiera de dos estados distintos (A y B) en algún rango de temperatura finita, la concentración de equilibrio de las dos formas se puede escribir en términos de una constante de equilibrio: $K = \frac{[B]}{[A]}$. Por lo tanto, si la ocupación fraccionaria del estado B - el estado

de entalpía más alto - se denota por f , entonces: $K = \frac{f}{(1-f)}$. Por lo tanto, $f = \frac{K}{(1+K)}$.

El cambio de energía estándar de Gibbs para la reacción viene dado por:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K$$

Donde ΔH° y ΔS° son el cambio de entalpía y entropía de la reacción estándares.

Cuando ΔG° es cercano a cero ($\pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$) el sistema existe como una mezcla de los dos estados

La temperatura a la cual los dos estados son igualmente probables es la temperatura de fusión, T_m . A esta temperatura, la diferencia de energía de Gibbs entre los dos estados es cero y $T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ}$.

Supongamos ahora que la diferencia de entalpía entre los dos estados es $100 \text{ kcal mol}^{-1}$ y la T_m es 40° C (T_m reportada para DPPC). La entalpía del sistema en función de la temperatura puede calcularse a partir de $\langle \Delta H \rangle = \Delta H^\circ \frac{K}{(1+K)}$. El resultado se muestra en la Figura. 3.2. A, que es la función de entalpía vs temperatura para el sistema. La derivada de esta curva es igual a la tasa de temperatura de absorción de calor y es equivalente a la función de capacidad térmica en exceso C_p , dada por

$$C_p = \frac{d}{dT} \Delta H = \frac{K(1+K)^2 \Delta H^\circ}{RT^2}$$

Esta función se muestra en la Figura. 3.2. B. Es esta función de capacidad térmica que se puede obtener directamente mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC).

La curva de capacidad térmica contiene una gran cantidad de información útil:

(i) la integral bajo la curva es igual al cambio de entalpía para la transición del estado A al estado B (ΔH^0); (ii) la temperatura de fusión es aproximadamente la temperatura a la que C_p es máxima; y (iii) dado que la T_m es igual a $\frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ}$, también se puede calcular el cambio de entropía para la transición.[20]

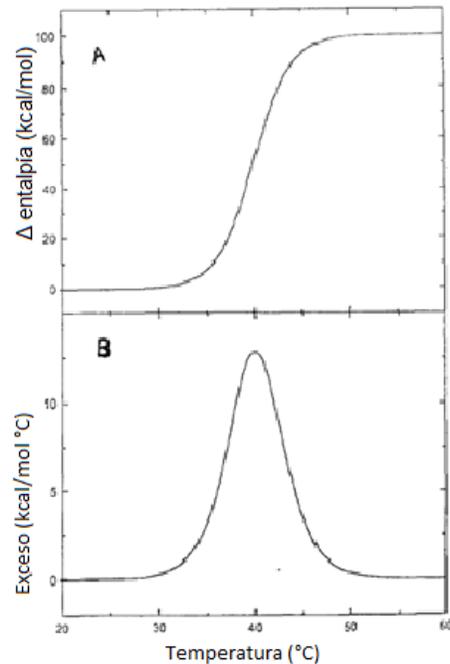


Figura. 3.2 Representación esquemática del termograma de fusión (a 40 ° C, dato de DPPC). A describe la dependencia de la diferencia de entalpía de la temperatura, B es la dependencia de la temperatura de Cp.

A partir de DSC se analizan las fases y transiciones de fases de los fosfolípidos que se obtiene de una traza calorimétrica. En las fosfatidilcolinas existen cuatro fases estables: fase L_c o fase sub-gel; L_β' o fase gel; P_β' o fase ondulada; fase líquida-cristalina desordena, L_α o fase fluida. Las correspondientes transiciones de fase son: sub-transición, T_s , que corresponde a la transición de la fase sub-gel a la tipo gel; la pre-transición, T_p , que corresponde a la transición de la fase gel a la fase ondulada; la transición principal, T_m , que corresponde al cambio de la fase ondulada a la fase fluida. Una breve descripción de cada una de las transiciones se da a continuación resumidas por Martínez (2016).

Sub-transición (T_s): es una transición meta-estable cuya aparición (pico endotérmico), depende de la historia térmica de la muestra. En la figura 3.3 no aparece, pues se requiere incubar la muestra a bajas temperaturas por varios

días. Esta transición está asociada con un incremento de desorden en la cadena alifática de los fosfolípidos.

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

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

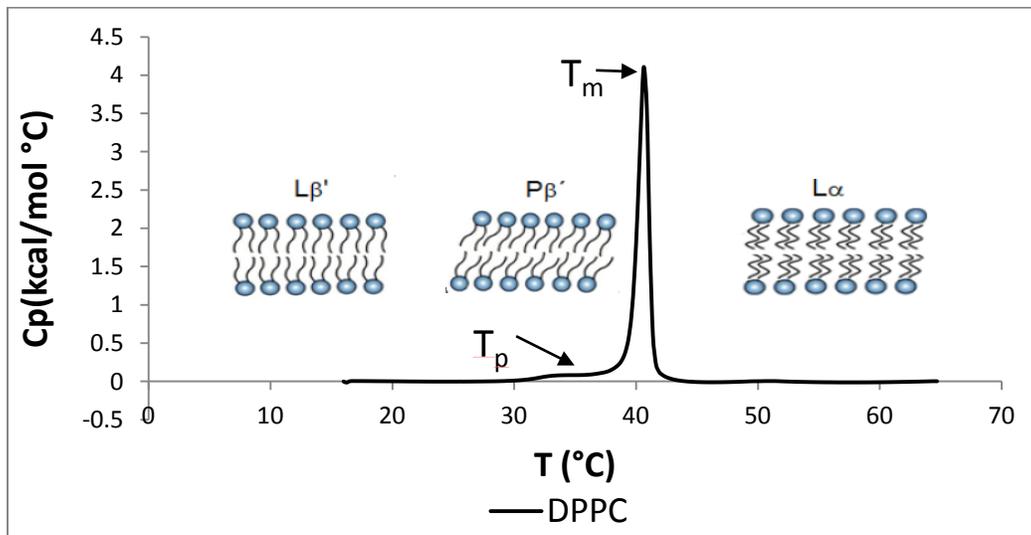


Figura 3.3 Termograma del liposoma DPPC obtenido en este trabajo.

Utilizando la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se pretende estudiar las transiciones de fase gel a líquido-cristalino de las bicapas de fosfolípidos.

En los liposomas, a temperaturas más bajas donde coexisten en estado gel, los fosfolípidos están altamente empaquetados por fuerzas de Van der Waals. En el inicio de transición de fase, los fosfolípidos funden cooperativamente. En el estado resultante líquido-cristalino, los fosfolípidos están más vagamente asociados, debido a las fuerzas de van der Waals debilitadas entre las cadenas de acilo, el debilitamiento de las interacciones polares de los grupos cabeza de los fosfolípidos, y una expansión lateral de las cadenas de acilo. Debido a que estas interacciones débiles de van der Waals dictan la estructura de la membrana, la longitud de las cadenas de acilo y la identidad del grupo cabeza del fosfolípido son los mejores contribuyentes a los cambios en la naturaleza de la transición de fase de gel a líquido-cristalino.

Cooperatividad de la transición de fase.

La transición de fase gel a líquido-cristalino es altamente cooperativa. Cuando se dice que las transiciones son cooperativas, antes de que se alcance la temperatura de transición debido al calentamiento, las moléculas comienzan a reorganizarse para pasar a asociarse juntas. La cooperatividad está definida como el ancho de temperatura a media altura de la transición de fase. En otras palabras, las moléculas cooperan juntas en ganar libertad de movimiento; cuando una molécula aumenta su energía al aumentar su movimiento, entonces, para otras moléculas cercanas a ella resultará más fácil agregar energía. Cuando la temperatura se aproxima a la temperatura de transición, T_m el rango de distancia de esta cooperación incrementa. Cerca de la temperatura de transición de fase, se pueden imaginar dominios de lípidos en una fase más móvil entremezcladas con la fase menos móvil fase gel. En estos dominios, los movimientos de las moléculas están altamente correlacionados. Estas interacciones correlacionadas ayudan en el cambio repentino de orden en la temperatura de transición de fase. Cuanto

mayor sea la cooperatividad, más estrecho es el intervalo de temperatura de la transición de fase.

La transición de fase de gel a cristal-líquido es de primer orden con algunas de las características de las transiciones de segundo orden. Las transiciones de primer orden tienen un cambio de entalpía y volumen a la temperatura de transición. En otras palabras, la transición de primer orden son cambios abruptos en las propiedades del sistema en la temperatura de transición de fase. A este respecto, una transición de fase de primer orden es completamente correlacionada, que es completamente cooperativa. En una transición de fase de primer orden todas las moléculas se someten a la transición de fase juntas, sujetándose únicamente a la disponibilidad de energía térmica. Una transición de primer orden puro tiene una transición brusca infinitamente. Las transiciones de fase de segundo orden no tienen cambios de entalpía y volumen a la temperatura de transición. Para transiciones de fase de segundo orden, la presencia de cooperatividad, debe a movimientos correlacionados con amplios rangos limitados (los dominios anticipan la transición o inician la transición temprana).

3.1.1 Perfiles de transición.

Pequeñas moléculas se pueden acomodar entre las cadenas de acilo de los liposomas, como es el caso de la PINO y se espera que el efecto perturbador de estos aditivos influya en el modo de empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas, por lo tanto, en la transición de fase. En una bicapa en fase gel, el movimiento en una cadena de ácido graso se transmite en cierta medida a las cadenas adyacentes, y así sucesivamente a varias moléculas que forman una unidad cooperativa. De hecho, el efecto depende tanto de la estructura como de la concentración del aditivo. [21]

Resultados sugieren que en un cierto intervalo de temperatura, los diversos aditivos pueden usarse para inducir una transición de fase en la bicapa lipídica.

Hay propuestas que indican que las diferencias cualitativas y cuantitativas en las características de transición surgen de una diferencia en la localización de solutos.

El perfil de transición medido por calorimetría diferencial de barrido describe las propiedades de fase de la bicapa lipídica modificada por los diversos aditivos. La figura 3.4 representa el comportamiento de la bicapa lipídica en función de la concentración del aditivo, la cual va aumentando de A hasta F. A este tipo de perfil se le conoce como “perfil de transición tipo A↓”, e implica que el tamaño de la unidad cooperativa del aditivo provoca que la transición en dicha bicapa modificada sea pequeña. Al aumentar la concentración del aditivo, T_m disminuye y $T_{1/2}$ crece. La forma de los perfiles tipo A↓ también es consistente con la explicación de que la bicapa modificada puede consistir en un rango de fases que difieren sólo ligeramente en sus características de empaque hasta alcanzar la concentración de saturación de membrana que es caracterizada por la aparición de un doble pico.

Un perfil de transición agudo ligeramente desplazado a temperaturas más bajas (tipo C↓, figura 3.5) implica que el tamaño de la unidad cooperativa en la bicapa modificada permanece prácticamente sin cambios, y esto se ve reflejado en el comportamiento de $T_{1/2}$, que cambia sólo ligeramente.

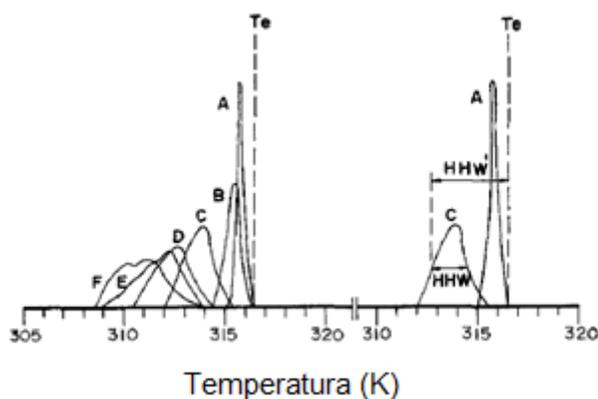


Figura 3.4 Perfil de transición de fase tipo A↓.

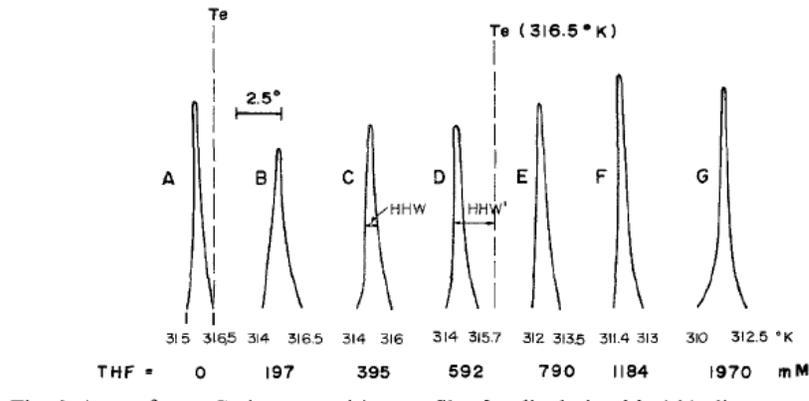


Figura 3.5 Perfil de transición de fase tipo C↓.

La aparición y permanencia de un nuevo pico (tipo B↓) implica que se forma una nueva fase modificada en la bicapa, que coexiste con la fase no modificada en el continuo de bicapa. Finalmente en el perfil tipo D↑, los picos permanecen claramente definidos al aumentar la concentración del aditivo. [22, 23]

En la figura 3.6 se muestra un perfil tipo B↓, donde las propiedades de la nueva fase están indicadas por la forma y la posición del nuevo pico. Un pico ancho u hombro indicaría que la nueva fase tiene unidades cooperativas más pequeñas, que no coexisten con la fase de fosfolípidos puros. Como cabría esperar, hay dos extremos de los perfiles de tipo B↓. La nueva fase podría ser líquida (sin unidades cooperativas), y por lo tanto, se observaría sólo el pico de transición principal cuya área disminuye al aumentar la concentración de aditivos.

En la figura 3.7, se muestra un perfil tipo D↑, donde la aparición de un nuevo pico agudo indicaría que la fase modificada tiene unidades cooperativas de tamaño comparable al de la fase no modificada. De forma similar, la posición del nuevo pico a lo largo del eje de temperatura indicaría si el cambio es a una temperatura más alta o más baja. En todos estos casos, el área bajo la curva dada, puede indicar la proporción del fosfolípido en esa fase.

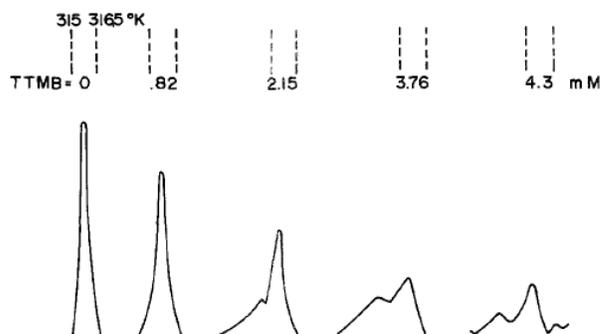


Figura 3.6 Perfil de transición de fase tipo B↓.

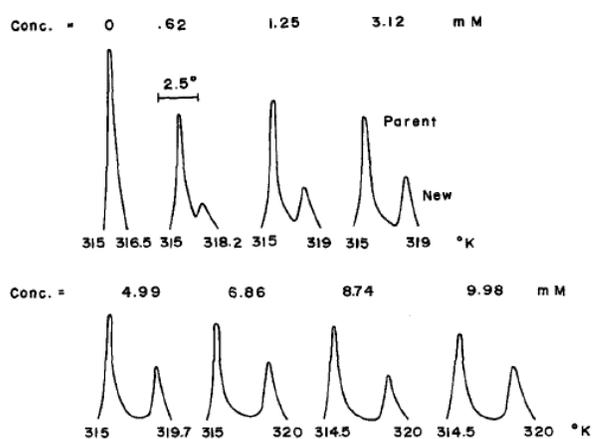


Figura 3.7 Perfil de transición de fase tipo D↑.

Los tipos de compuestos que modifican el perfil de transición de fase son particularmente interesantes. Las moléculas que inducen el perfil tipo A↓ son generalmente largas con un extremo polar y el otro extremo no polar (C_5 y alcoholes superiores, ácidos alcanoicos, algunos detergentes). Por el contrario, los compuestos que inducen el perfil de tipo C↓ son pequeños con un carácter dipolar débil.

Los compuestos que inducen el perfil de tipo B↓ tienen forma de disco y son asimétricos. La mayoría de los hidrocarburos pequeños no muestran ningún efecto en el perfil de transición de fase a menos que estén presentes en alta concentración, cuando pueden empujarse hacia la región densamente

empaquetada. Las moléculas débilmente dipolares tenderían a localizarse más hacia la interfaz, debilitando así el empaquetamiento intermolecular.

Los solutos de tipo $D\uparrow$ interactúan estequiométricamente con los fosfolípidos en la región del grupo polar. Las dos fases que se forman, tienen diferentes características de empaquetamiento y, por lo tanto, diferentes temperaturas de transición. Si el empaque en la nueva fase es más ajustado, su temperatura de transición será mayor. Si se supone que la interacción entre un soluto de tipo $D\uparrow$ y un fosfolípido en la bicapa es estequiométrica, la aparición de la nueva fase dependería de la concentración. Por lo tanto, como una función de la concentración aditiva de tipo $D\uparrow$, el área del nuevo pico cambiaría. Además, la aparición de una nueva fase por un aditivo tipo $D\uparrow$ puede (no necesariamente) acompañar la desaparición o reducción en el área del pico original. Una disminución en el área del pico principal ocurriría sólo si el soluto interactúa con el fosfolípido en la fase de gel responsable del pico principal. Por el contrario, si el soluto interactúa con el fosfolípido en la fase líquido-cristalino, la aparición del nuevo pico no acompañaría la desaparición de la fase original no modificada. De hecho, ambas de estas posibilidades se han observado.

Los perfiles tipo $B\downarrow$ surgirían de una combinación de los mecanismos propuestos para los perfiles tipo $D\uparrow$ y tipo $A\downarrow$. La fase modificada por los solutos tipo $B\uparrow$ coexiste con la fase no modificada. Sin embargo, la fase modificada tiene pequeñas unidades cooperativas y / o tiene características de embalaje claramente diferentes. Se esperaría una perturbación de este tipo si el soluto estuviera localizado en la región del esqueleto de glicerol. [24]

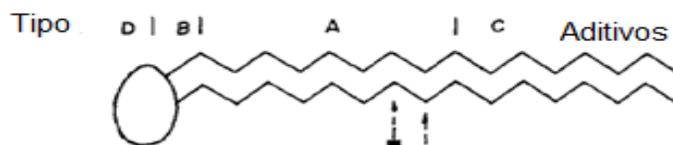


Figura 3.8 Diagrama esquemático (no dibujado a escala) que ilustra las diversas características del empaquetamiento intermolecular dentro de una fase de la bicapa.

En la figura 3.8 se representan las posibles regiones de localización de los diversos aditivos que inducen perfiles de transición de fase cualitativamente distintos cuando se incorporan en la bicapa lipídica de DPPC. Los solutos de tipo $D\uparrow$ pueden estar localizados en la región de fosforilcolina; los solutos tipo $B\downarrow$ cerca de la interfaz; tipo $A\downarrow$ en la región C_1 - C_9 ; tipo $C\downarrow$ en la región C_{10} - C_{16} .

3.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

3.2.1 Tamaño de partícula.

El estado físico se puede monitorear midiendo la distribución de tamaño de los liposomas. Esto se ha hecho usando la metodología de dispersión dinámica de la luz. La Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés, Dynamic Light Scattering), conocida también como Espectroscopía de Foto-correlación o Dispersión Cuasi-Elástica, pertenece a un conjunto de técnicas basadas en el estudio de la interacción radiación-materia. Esta técnica tiene un fundamento teórico basado en: i) la teoría de dispersión de Rayleigh (para partículas pequeñas y esféricas), ii) la teoría de Mie (partículas esféricas de tamaño superior a la longitud de onda) y iii) la teoría de Stokes-Einstein (la cual no considera la estructura molecular sino las fluctuaciones del índice de refracción). Todo esto permite obtener información dinámica de las partículas coloidales que se mueven al azar (movimiento Browniano) como el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico. El fenómeno físico de dispersión que se debe a la interacción radiación-materia se muestra en la figura 3.9, donde el plano de dispersión viene dado por la radiación incidente I_i , y la radiación dispersada I_d , ambas relacionadas mediante el ángulo de dispersión θ . La intensidad dispersada es la fluctuación que llega al detector por la muestra, ésta varía con el tiempo. [12]

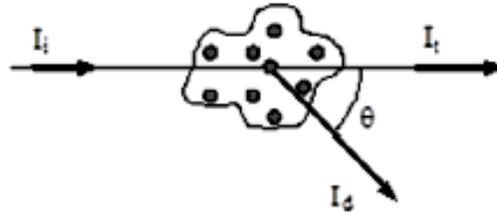


Figura 3.9. Fenómeno físico de la dispersión de luz debido a la interacción radiación-materia.

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

Si una pequeña partícula es iluminada por una fuente de luz tal como un láser, la partícula dispersará la luz en todas las direcciones. Si una pantalla se mantiene cercana a la partícula, esta pantalla puede ser iluminada por la luz dispersada. Considerando ahora la sustitución de una partícula individual por miles de partículas estacionarias, la pantalla mostrará patrones de manchas, es decir, un patrón que consiste en áreas brillantes y oscuras, esto se muestra gráficamente en la figura 3.10 debido a que la luz dispersada al llegar a la pantalla con la misma fase actúa de manera constructiva y forma un área brillante. Las áreas oscuras de las adiciones de fase son mutuamente destructivas y se cancelan una con la otra.

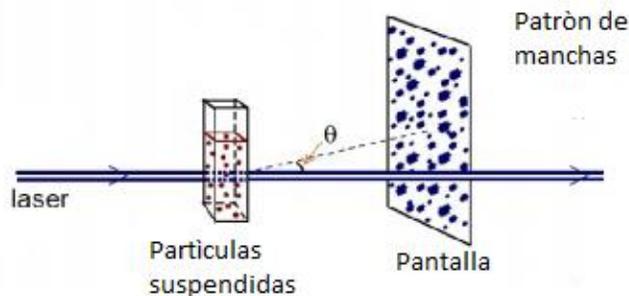


Figura 3.10 Patrón de manchas obtenidas por el fenómeno de dispersión de luz.

Dado que las partículas están en constante movimiento, el patrón de manchas también se moverá. A medida que las partículas se mueven alrededor, la fase constructiva y destructiva de la luz dispersada hará que las áreas brillantes y oscuras crezcan y disminuyan en intensidad, es decir la intensidad en un punto determinado fluctuará (la fase de adición de las partículas que se mueven están en constante evolución y formación de nuevos patrones). Entonces lo que se mide son las fluctuaciones de la Intensidad de la luz dispersada (figura3.11).

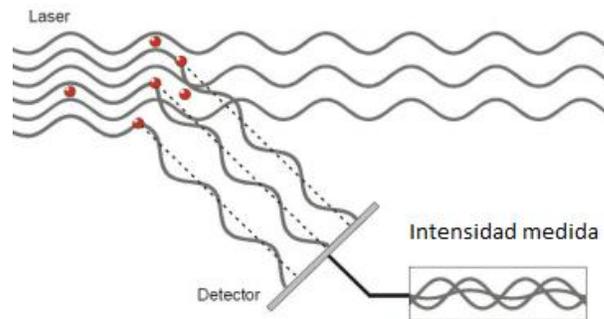


Figura 3.11 Fluctuaciones de luz dispersada incidiendo en el detector.

Para un sistema de partículas que presentan un movimiento Browniano se obtiene un patrón de manchas donde la posición de cada una de ellas cambia constantemente, esto es debido a que la suma de las fases de las partículas en movimiento evoluciona constantemente y forma nuevos patrones. La rapidez a la cual estas fluctuaciones de intensidad ocurren dependiendo del tamaño de las partículas. La figura 3.12 muestra esquemáticamente donde las fluctuaciones tendrán una mayor intensidad si las partículas son grandes, y fluctuaciones menores si las partículas son pequeñas.

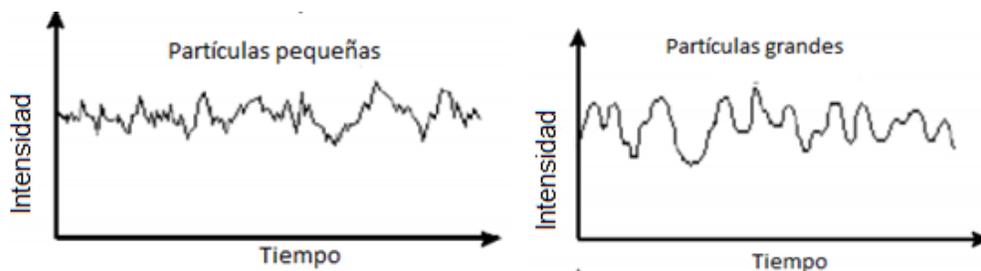


Figura 3.12 Intensidad típica de las fluctuaciones de las partículas grandes y pequeñas.

Como ya se ha mencionado, la dispersión dinámica de luz mide las fluctuaciones que resultan del movimiento Browniano, mediante la intensidad de dispersión con respecto al tiempo, para determinar el coeficiente de difusión translacional (D), y el radio hidrodinámico. La velocidad del movimiento Browniano es definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional (usualmente dado por el símbolo, D). Una vez determinado el coeficiente de difusión, es posible conocer el tamaño de las partículas en la disolución mediante la ecuación de Stokes-Einstein (suponiendo a dilución infinita y la ausencia de interacciones entre las partículas esféricas).

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

Donde:

$d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión translacional, k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y η la viscosidad

Para entender e interpretar los parámetros de distribución (intensidad, volumen y número) que se obtienen como resultado de la medición, supongamos que se tiene una muestra que contiene sólo dos tamaños de partícula, 5nm y 50nm, pero con números iguales de cada tamaño de partícula. [25]. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

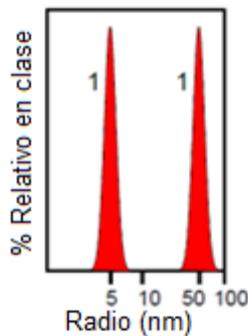


Figura 3.13 Resultados de un número de distribución, con dos señales del mismo tamaño, ya que hay igual número de partículas.

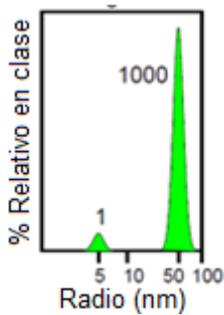


Figura 3.14 Resultado por volumen de distribución.

El área del pico para las partículas de 50nm es 1,000 veces mayor que el pico de 5nm (relación 1:1000). Esto es debido a que el volumen de una partícula de 50nm es 1,000 veces más grande que la partícula de 5nm. $V = 4/3 \pi (d/2)^3$

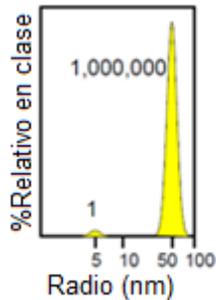


Figura 3.15 Resultado por intensidad.

El área del pico de las partículas de 50nm es ahora 1,000,000 veces más grande que el pico de 5 nm (relación 1: 1,000,000). Esto es porque las partículas más grandes dispersan mucho más la luz que las partículas pequeñas, la intensidad de la dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro (aproximación de Rayleigh).

$$I = I_0 \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6$$

La figura 3.16 muestra un arreglo típico de un sistema de dispersión dinámica de luz y está formado por 6 componentes principales. (1) Un rayo láser que es la

fuente de luz que ilumina la muestra contenida en (2) una celda. Para soluciones diluidas la mayor parte del rayo láser pasa a través de la muestra, pero una fracción es dispersada por las partículas de la muestra en un ángulo θ . (3) Un detector, es usado para medir la intensidad de luz dispersada en un ángulo de 173° . La intensidad de la luz dispersada debe estar en el rango específico para que el detector lo pueda medir exitosamente. Si la señal es muy grande el detector puede ser saturado, por lo cual es necesario usar (4) un atenuador para reducir la intensidad del rayo láser y por lo tanto la intensidad de la luz dispersada. (5) Un Correlacionador, es el dispositivo en el que la señal de Intensidad de Dispersión que viene del detector, se hace pasar por un tablero de procesamiento de señal digital (compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo consecutivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable). Finalmente los datos obtenidos son analizados mediante un software en (6) una computadora y se obtiene el tamaño de partícula.

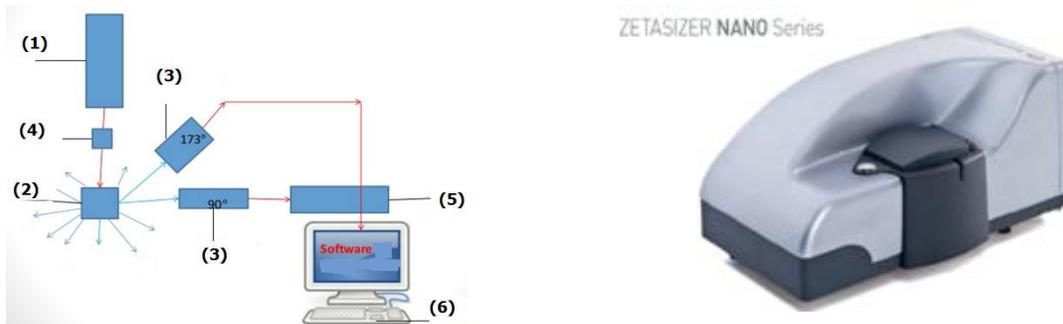


Figura 3.16 Esquema del sistema interno del DLS (izquierda) y DLS NANOSIZER ZS ZEN (3600) utilizado en el experimento (derecha).

3.2.2 Potencial Z.

El potencial Z es un factor importante que proporciona información con respecto a la carga superficial de los liposomas en medio acuoso.

El potencial zeta es un buen indicativo de las interacciones electrostáticas entre las partículas y se usa normalmente para predecir la estabilidad de una dispersión.

Se obtiene a partir de la movilidad electroforética, μ_e , concepto que se resume a continuación. El efecto electrocinético más estudiado y de especial relevancia en suspensiones coloidales se llama electroforesis o microelectroforesis. La electroforesis es el movimiento que sufren las partículas cargadas en un líquido tras aplicarse un campo eléctrico externo y paralelo a la interfase partícula-disolución. La velocidad que adquieren las partículas, v_e , se relaciona con el campo eléctrico aplicado, E_e , a través de la movilidad electroforética, μ_e , según la expresión:

$$v_e = \mu_e E_e$$

En la frontera entre la fase móvil y la fase inmóvil, conocida como plano de deslizamiento, se genera un potencial denominado potencial electrocinético o potencial zeta, ξ , que no tiene por qué coincidir con el potencial superficial, Ψ_0 , aunque como éste último no se puede medir directamente, se suele suponer que son iguales. ξ está relacionado con la movilidad electroforética y se puede calcular de distintas formas, en función del tamaño de la partícula. Las formas más utilizadas para relacionar potencial zeta y movilidad electroforética son tres: aproximación de Smoluchowski, aproximación de Hückel y ecuación de Henry.[26]

1. Aproximación de Smoluchowski o de la doble capa fina [27]: es la primera aproximación que se desarrolló para calcular el potencial zeta a partir de medidas experimentales de movilidad electroforética. Considera que las partículas coloidales son esféricas y que su radio, a , es mucho más grande que el espesor de la doble capa eléctrica, k_D^{-1} , tal como se representa en la Figura 3.17(a). Bajo estas condiciones, el campo eléctrico aplicado afecta al movimiento de la partícula, ya que ésta experimenta un campo distorsionado, y se cumple la expresión:

$$\xi = \frac{\eta}{\epsilon_r \epsilon_0} \mu_e$$

donde η es la viscosidad del disolvente, ϵ_0 y ϵ_r son las permitividad del vacío y del disolvente, respectivamente.

2. Aproximación de Hückel o de la doble capa gruesa: considera que las partículas coloidales son esféricas y que su radio, a , es mucho más pequeño que el espesor de la doble capa eléctrica, k_D^{-1} , tal como se muestra en la Figura 3.17 (b). Bajo estas condiciones el campo eléctrico aplicado no provoca ningún movimiento del líquido situado alrededor de la partícula, es decir, la partícula experimenta el campo casi sin distorsionar, y se cumple:

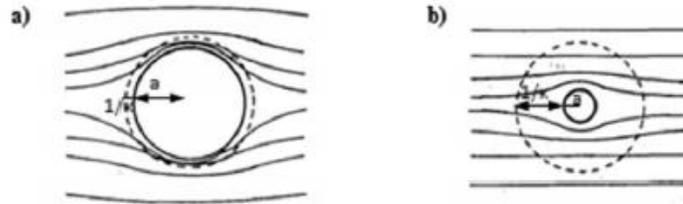


Figura 3.17 Distorsión del campo eléctrico aplicado sobre una partícula coloidal. a) para dobles capas finas, $k_D \gg 1$ o $a \gg 1$, existe una mayor proporción de iones de electrolito que experimentan un campo distorsionado. b) para dobles capas gruesas, $k_D a \ll 1$ o $a \ll 1$, existe una mayor proporción de iones de polielectrolito que experimentan el campo original sin distorsionar [27].

$$\zeta = \frac{3}{2} \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \mu_e$$

3. Ecuación de Henry: Henry fue el primero en resolver el problema para esferas de cualquier radio, a , es decir, para cualquier valor de $k_D a$, llegando a la siguiente ecuación:

$$\zeta = \frac{3}{2} \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0 f(k_D a)} \mu_e$$

Siendo $f(k_D a)$ la función de Henry, que incluye las deformaciones en la polarización de la doble capa eléctrica de la partícula debida al campo eléctrico aplicado, y viene dado por la expresión:

$$f(k_D a) = 1 - e^{k_D a} \{5E_7(k_D a) + 2E_5(k_D a)\}$$

donde $E_i(k_D a)$ es una integral exponencial de orden i . Este factor se puede calcular para partículas esféricas usando las siguientes aproximaciones:

- Para valores de $k_D a$ bajos $k_D a < 1$:

$$f(k_D a) = 1 + \frac{(k_D a)^2}{16} - 5 \frac{(k_D a)^3}{48} - \frac{(k_D a)^4}{96} \dots$$

En el límite la ecuación queda como, $f(k_D a) = 1$, la ecuación de Hückel.

- Para valores de $k_D a$ altos, que se dan en medios viscosos $k_D a > 1$:

$$f(k_D a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2(k_D a)} + \frac{75}{(k_D a)^2} - \frac{330}{(k_D a)^3} \dots$$

En el límite la ecuación queda como, $f(k_D a) = 3/2$, la ecuación de *Smoluchowski*.

La magnitud del potencial zeta indica la estabilidad del sistema, observándose que los sistemas coloidales no son estables en el intervalo comprendido entre -30 y +30 mV.

Para medir el potencial zeta se ha utilizado la técnica de Electroforesis Láser Doppler (LDE por sus siglas en inglés), basada en el principio básico del efecto Doppler, que supone la variación de frecuencia de cualquier tipo de onda emitida o recibida por una partícula en movimiento. Esta técnica implica la utilización de un par de haces láser coherentes procedentes de una única fuente y enfocados, mediante unos espejos, hacia un punto concreto de la celda de medida en la cual se cruzan, iluminando las partículas que pasan. Este punto está localizado sobre la capa estacionaria, en el cual el efecto de la electroósmosis es nulo y, por tanto, la velocidad de las partículas se debe únicamente a su velocidad electroforética. Además, en este punto se generan franjas de interferencia de Young, de espaciado conocido, con las que interactúan las partículas dispersando luz, cuya intensidad fluctúa con una frecuencia que está relacionada con la velocidad de las partículas. La luz dispersada se recoge mediante un detector enfocado hacia el punto de cruce de los haces, el cual alimenta un correlador digital que determina la función de autocorrelación, a partir del cual se obtiene la movilidad electroforética de las partículas.

Esta técnica permite determinar el potencial zeta de partículas muy pequeñas, desde 5 nm, obteniendo muy buenos resultados, comparados con los obtenidos mediante instrumentos tradicionales, ya que el número de partículas en el volumen de dispersión es muy grande [26].

Los experimentos fueron realizados empleando un equipo Zeta Nanosizer modelo ZS(3600) de Malvern Instruments USA, el mismo utilizado en la sección 3.2.1, en la figura 3.16.

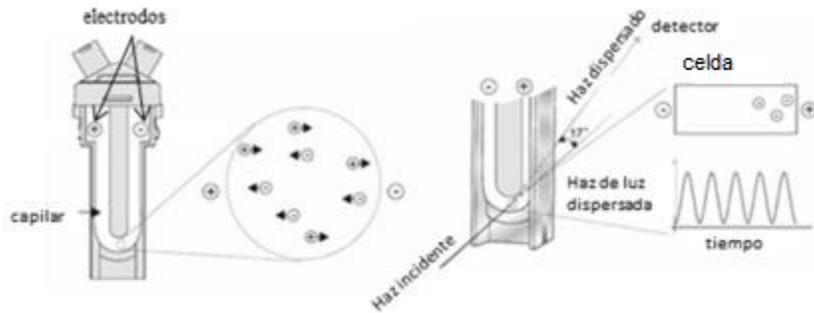


Figura 3.18 Celda de medida y esquema del proceso de medida por LDV. Representación del movimiento de los iones hacia los electrodos en la célula cuando se aplica un potencial, donde la velocidad de los iones es la velocidad electroforética.

Lo que cambia en este método es la celda de medida. Es una desechable tipo DTS1060/DTS1061 (Figura 3.18), que posee dos electrodos a través de los cuales se aplica el campo eléctrico externo. Esta celda se ha calibrado con un patrón de látex, suministrado por el fabricante, de potencial zeta conocido ($\xi = -50 \pm 5$ mV).

El equipo está conectado a un ordenador. Tanto el manejo del equipo como el almacenamiento de los datos se llevan a cabo de forma automática mediante el programa suministrado por el fabricante, Malvern.

3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

El microscopio electrónico de barrido convencional (SEM, Scanning Electron Microscope, por sus siglas en inglés) es un instrumento cuyo funcionamiento se base en el barrido de una superficie de una muestra, por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido. En la figura 3.19 se ve el microscopio electrónico de barrido utilizado en esta investigación.



Figura 3.19 Microscopio Electrónico multifuncional JEOL JSM-5900-LV.

En SEM, la imagen se forma punto por punto escaneando un haz de electrones a través de la superficie de una muestra sólida. Los electrones primarios penetran en la muestra sólida y son desviados por una gran cantidad de procesos de dispersión elástica. El espectro de energía de electrones que salen de la muestra es recogido por el detector. El sistema da como resultado información específica y dos tipos diferentes de contraste. El contraste topográfico surge principalmente de la señal de electrones secundarios (SE, siglas en inglés). La topografía de la superficie casi tridimensional puede grabarse principalmente debido a SE, es decir, todos los electrones emitidos con energías de salida por debajo de 50 eV. SE puede dejar el espécimen sólo desde dentro de una fina capa superficial de unos pocos nanómetros de espesor. En este caso, el contraste de la imagen depende del rango angular seleccionado de los electrones recogidos. Además, el material de contraste o el contraste atómico numérico se puede obtener mediante el análisis de la energía superior de electrones retrodispersados (BSE, siglas en inglés), es decir, electrones con energías entre 50 eV y la energía primaria, cuando pasan a través de la superficie. Este contraste corresponde a un aumento en la intensidad al aumentar número atómico medio. Una de las características más ventajosas del análisis SEM es la pronunciada profundidad de foco en combinación con el particular método de formación de imágenes: las áreas proyectadas aparecen como sombras mientras las áreas empotradas aparecen

oscuras. Por lo tanto, la imagen permite al ojo humano interpretar y comprender fácilmente la información obtenida. [28]

3.4 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

En experimentos TEM, se emplea un haz de electrones de alto voltaje para crear una imagen. Los electrones son emitidos por un cañón de electrones, comúnmente equipado con un cátodo de filamento de tungsteno como fuente de electrones. En la Figura 3.20 se muestra el microscopio electrónico de transmisión que se utilizó en esta investigación



Figura 3.20 Microscopio electrónico de transmisión multifuncional JEOL JEM-2010, resolución: 0.14 nm, amplificación: 3000-1500k.

Una fuente confiable de electrones para 'iluminar' la muestra es una de las partes más importantes de un TEM. Existen requisitos rigurosos para producir el haz de electrones con las propiedades necesarias y estos se satisfacen mejor con sólo dos tipos de fuentes: fuentes termoiónicas y de emisión de campo. Las fuentes termoiónicas son filamentos de tungsteno o, con mayor frecuencia en la actualidad, cristales de hexaboruro de lantano. Los emisores de campo son agujas finas de tungsteno [29]. El haz de electrones se acelera por un ánodo típicamente a 100 keV con respecto al cátodo, se enfoca mediante lentes electrostáticas y electromagnéticas, y se transmite a través de la muestra que es en parte transparente a los electrones y en parte dispersa fuera de la viga. Algunos electrones colisionan con la muestra y desplazan electrones alrededor de los núcleos de átomos en la muestra. Los electrones son recogidos, enfocados y magnificados por lentes para producir una imagen proyectada. Por lo tanto, al salir de la muestra, el haz de electrones transporta información sobre la estructura de la muestra que se magnifica por el sistema de lente objetivo del microscopio. La variación espacial en esta información, es decir, la "imagen", puede verse proyectando la imagen de electrones ampliada sobre una pantalla de visualización fluorescente revestida con un material de fósforo o centellador tal como sulfuro de zinc. Alternativamente, puede acoplarse una guía de luz de fibra óptica al sensor de una cámara de dispositivo de acoplamiento de carga (CCD, siglas en inglés). La imagen detectada por el CCD puede mostrarse en un monitor o computadora. Para mejorar los niveles de ruido, se están desarrollando sistemas de detección que pueden detectar electrones directamente [30].

Las cámaras CCD modernas están diseñadas para ofrecer alta resolución y velocidad de lectura de TV para aplicaciones de imágenes tanto en ciencias de la vida como de materiales. Por lo tanto, los mejores rendimientos se obtienen actualmente mediante la combinación de tecnología de resolución óptica de alto contraste y electrónica avanzada de lectura CCD. La formación de contraste en las imágenes microscópicas electrónicas generalmente se logra mediante el contraste de amplitud y el contraste de fase [31]. Para muestras delgadas con pequeñas diferencias de densidad que generan poca dispersión de electrones, como

muestras criogénicas, el contraste de la imagen se genera principalmente por el contraste de fase. Esto significa que el contraste se produce por las diferencias en las fases de las ondas de electrones en combinación con el ajuste del desenfoque del microscopio, así como la calidad de la lente del objetivo. El espesor de la muestra en TEM está generalmente limitado a unos pocos cientos de nanómetros para permitir una formación de imagen adecuada. Para esto, un número suficientemente grande de electrones tiene que pasar a través de la muestra y así puede contribuir a la formación de la imagen. La principal limitación en microscopía electrónica se establece por el riesgo de daño por radiación causado por el haz de electrones, es decir, por la interacción de los electrones con la muestra. Los electrones pueden ionizar la muestra, lo que resulta en la ruptura de los enlaces atómicos y la generación de radicales libres. La difusión de radicales libres y la pérdida de masa puede causar daño físico a la muestra. El alcance del daño depende de la dosis de electrones que se requiere para la obtención de imágenes, que a su vez depende del instrumento empleado. La alta resolución obtenida en EM es causada por la fuerte interacción de los electrones y la muestra, que puede causar la degradación de muchas estructuras de cristal. El riesgo de daño al haz se puede minimizar mediante dos enfoques. En primer lugar, el enfriamiento de la muestra como en las técnicas de cryo EM conduce a una reducción de los procesos implicados en el daño del haz, que son más fuertes a temperatura ambiente. En segundo lugar, generalmente se debe emplear un esquema cuidadoso de imágenes de baja dosis para minimizar la dosis de electrones en las áreas de interés de la muestra: la búsqueda y el enfoque se realizan con un aumento mínimo y la dosis de electrones, el enfoque preciso con gran aumento se realiza en un lugar prescindible cerca del área de interés [31].

Los avances más recientes en la instrumentación TEM permiten obtener imágenes de alta resolución con presiones de gas tan altas como un pequeño porcentaje de la presión atmosférica en la cámara de muestras. Los TEM convencionales requieren condiciones de alto vacío con niveles de presión de mil a mil millones de veces más bajos. Un controlador de gas permite un control preciso de la composición del gas y de la presión. Los soportes de calefacción y refrigeración

proporcionan control sobre un amplio rango de temperaturas. La capacidad de seleccionar voltajes de haz de electrones en cualquier lugar entre 80 y 300 kilovoltios (kV) permite una amplia gama de materiales y condiciones de imagen. Sin embargo, estas técnicas sólo recientemente han encontrado su camino de éxito en la investigación farmacéutica.

3.5 Espectrofotometría de UV-Visible.

Los espectrofotómetros son instrumentos empleados en los laboratorios de análisis cuantitativo para determinar el contenido de una determinada sustancia en un líquido. La base de su funcionamiento consiste en emitir un haz de luz monocromática, a una longitud de onda determinada. En estas condiciones se hace que el haz atraviese el líquido a analizar y medir la cantidad de luz que logró pasar. A esta cantidad de luz se le llama transmitancia, y por otro lado, a la que no ha conseguido pasar, absorbancia. [32]

Normalmente, la concentración c de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como representa la siguiente ecuación

$$A = -\log T = \log \frac{P_o}{P} = \epsilon bc$$

Donde T es la transmitancia, A es la absorbancia, P_o y P son potencia radiante, ϵ es el coeficiente de extinción, b es la longitud de la cubeta (en cm) y c es la concentración molar.

Se dice que una sustancia cumple con la ley de Lambert-Beer cuando presenta linealidad fotométrica. Es decir, que cuando se realiza una gráfica de su absorbancia a distintas concentraciones, se obtiene una recta. Esto permite realizar líneas patrón a partir de varios resultados a concentraciones conocidas, así pues, cuando se obtiene la absorbancia de una muestra problema, el resultado se plasma sobre la gráfica y muestra la concentración de la sustancia buscada.

La figura 3.21 muestra el esquema de un espectrofotómetro que posee una fuente de luz y un filtro que permite pasar sólo la luz de longitud de onda deseada. En su trayecto se interpone una cubeta de materiales especiales (cuarzo, cristal o plástico), que contiene la disolución problema. Finalmente un sensor determina la cantidad de luz que ha pasado (transmitancia), que restada de la cantidad de luz inicial, da el valor de la absorbancia. Este valor es el que lanza el equipo en la pantalla.

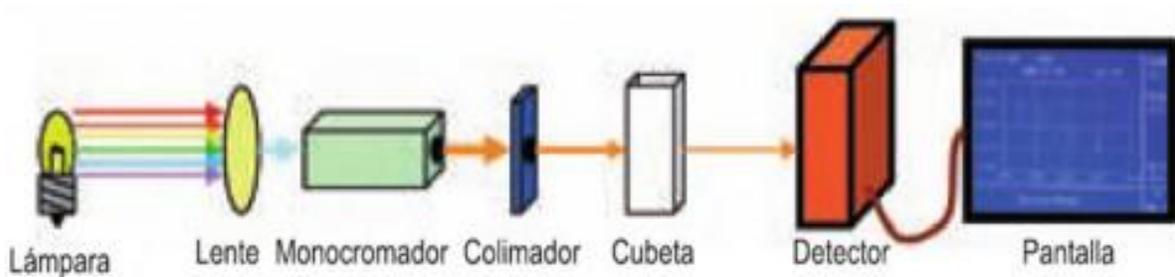


Figura 3.21 Esquema de un espectrofotómetro.

En la figura 3.22 se muestra una cubeta para la medición, donde se puede ver que, en las dos interfases aire/pared de la cubeta, así como en las dos interfaces pared/disolución tienen lugar reflexiones. La atenuación del haz resultante es primordial, ya que una fracción de haz de luz se pierde por reflexión en su paso a través de una cubeta de vidrio rellena de agua. Además, la atenuación del haz puede ocurrir como consecuencia de la dispersión causada por moléculas grandes y, a veces, de la absorción por las paredes del recipiente. Para compensar todos estos efectos, la potencia del haz transmitido por la disolución del analito se compara, generalmente, con la potencia del haz transmitido de la misma cubeta que contenga sólo disolvente. [33]

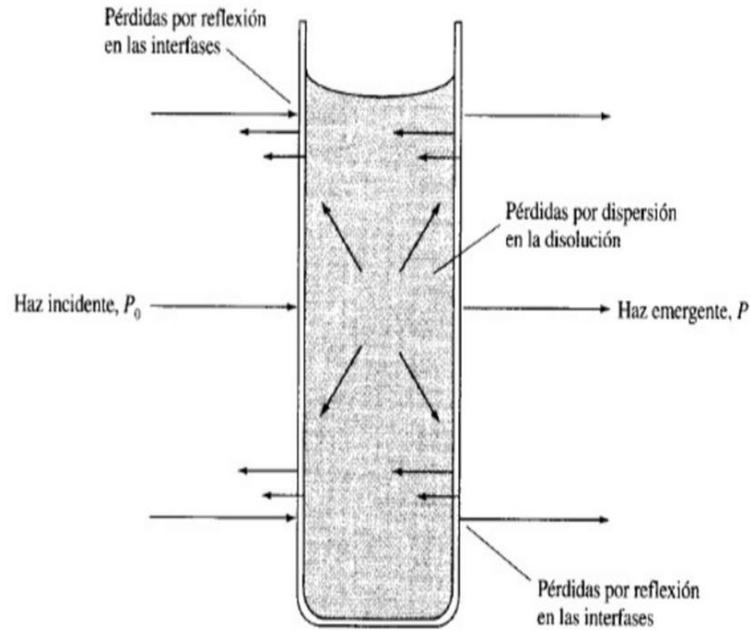


Figura 3.22 Pérdidas por reflexión y dispersión.

3.5.1 Eficiencia de encapsulación.

Utilizando la espectrofotometría se puede calcular la eficiencia de encapsulación de los sistemas liposomales formados. La eficacia de encapsulación (EE%) se define por la concentración del material incorporado (tales como ingredientes activos, fármacos, fragancias, proteínas, pesticidas, agentes antimicrobianos, etc.) detectados en la formulación sobre la concentración inicial utilizada para preparar la formulación. La eficiencia de encapsulación (EE%) se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{[PINO]_{total} - [PINO]_{no\ encapsulada}}{[PINO]_{total}} * 100$$

Si la molécula incorporada no es soluble en ese disolvente, puede cambiarse de fase utilizando un disolvente en el cual si sea soluble.

La eficiencia de la encapsulación puede verse influenciada por (i) el coeficiente de partición de la molécula objetivo en los solventes utilizados en la preparación de la formulación, (ii) el método utilizado para llevar a cabo el proceso de encapsulación (temperatura, pH, estrés mecánico) y (iii) la distribución del tamaño de las cápsulas.[34]

4 Desarrollo experimental.

4.1 Reactivos.

- ✓ Pinocembrina. Marca Sigma-Aldrich. Sólido. Fórmula condensada $C_{15}H_{12}O_4$. Masa molar $256.25 \text{ g mol}^{-1}$. Pureza 95%. Lote # MKBZ2780V. Almacenamiento de $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$. Punto de fusión $194-195 \text{ }^\circ\text{C}$.
- ✓ Dipalmitoilfosfatidilcolina. Marca Sigma-Aldrich. Sólido. Fórmula condensada $C_{40}H_{80}NO_8P$. Masa molar $734.04 \text{ g mol}^{-1}$. Pureza 99%. Lote 109F8365. Almacenamiento a -20°C . T_m 40°C , CMC $4 \times 10^{-7} \text{ mM}$. Punto de fusión $225-235^\circ\text{C}$.
- ✓ Colesterol. Marca Sigma-Aldrich. Sólido. Fórmula condensada $C_{27}H_{46}O$. Masa molar $386.65 \text{ g mol}^{-1}$. Pureza 98%. Punto de fusión $148.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Solubilidad en agua 0.94 mg L^{-1} . Soluble moderadamente en alcohol.
- ✓ Diclorometano. Marca J.T. Baker. Líquido. Fórmula condensada CH_2Cl_2 . Masa molar 84.93 g mol^{-1} . Pureza 99.98%. Lote T34C64. Punto de ebullición $39-40^\circ\text{C}$. Almacenamiento en un lugar fresco, seco y bien ventilado.
- ✓ Protamina. Marca Sigma-Aldrich. Sólido. Masa molar: aproximadamente 5.1 kDa. Almacenamiento a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- ✓ Acetona. Líquido. Fórmula condensada C_3H_6O . Masa molar 58.08 g mol^{-1} . Punto de ebullición $56.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Almacenar entre 5 y 30°C .
- ✓ Etanol grado técnico. Líquido. Fórmula condensada C_2H_5OH . Masa molar 46.07 g mol^{-1} . Pureza 96 %. Punto de ebullición 78°C . Almacenar entre 5 y 30°C .
- ✓ Alcohol Etilico Absoluto Anhidro. Marca J.T. Baker. Líquido. Fórmula condensada CH_3CH_2OH . Masa molar 46.07 g mol^{-1} . Pureza 99.9%. Lote L46C59. Punto de inflamabilidad $13 \text{ }^\circ\text{C}$. Almacenar en recipientes bien cerrados. Temperatura ambiente.
- ✓ Agente limpiador para DSC. Hidróxido de potasio. Contrad 70. Marca Decon Labs. Inc.
- ✓ Agua destilada y desionizada.

4.2 Equipos.

- Balanza analítica. Marca OHAUS. Modelo Analytical Plus, Suiza. No Serie 1118453077.
- Sonificador. Marca Cole-Parmer 8892.
- Extrusor. Marca LIPEX™ EXTRUDER. Canadá.
- Calorímetro Diferencial de Barrido. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo VP_DSC Microcalorimeter. No serie 06.99.138. USA.
- Desgasificador. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo TermoVac2. No serie 08.00.191. USA.
- Nanosizer. Marca Malvern instruments Ltd. Modelo ZS ZEN (3600). UK.
- Espectrofotómetro UV-Visible. Marca Varian. Modelo CARY 50. Australia.
- Centrífuga. Marca Hermle Cabortechinict GmbH. Modelo Drehzahl. No serie 2-416198. USA.
- Rotavapor Marca buchi. Modelo r-3 buchi Suiza.
- Desionizador. Marca Simplicity® Millipore. No de serie F1CA58004 A. Francia.

4.3 Preparación de suspensiones liposomales de DPPC, DPPC:PINO, DPPC:CHOL y DPPC:PINO:CHOL.

Tabla 4.1. Concentración de los diferentes componentes de los sistemas estudiados.

	DPPC		PINOCEMBRINA		COLESTEROL	
	Concentración		Concentración		Concentración	
	mM	mg mL ⁻¹	mM	mg mL ⁻¹	mM	mg mL ⁻¹
DPPC	9.7	7.12	--	--		--
DPPC:PINO	10.2	7.49	2.373	0.608	--	--
DPPC:CHOL	9.8	7.2	--	--	2.485	0.961
DPPC:PINO:CHOL	9.1	6.71	2.435	0.624	2.498	0.966

Materiales y equipos

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

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

Metodología.

La preparación del liposoma se realizó por el método de “hidratación de película delgada” (figura 3.18). Se lavó todo el material perfectamente con agua, acetona y alcohol para que no hubiera interferentes (no se debe utilizar ningún tipo de detergente). Para asegurarse de que dentro del matraz no haya partículas pegadas a las paredes, se hace una mezcla etanol- agua en la matraz y se sonica por 5 minutos. El baño maría debe estar a una temperatura por encima de la temperatura de transición (en este caso ~50°C.)

Se pesó la cantidad necesaria de DPPC para obtener una concentración aproximadamente de 10 mM. En el caso en el que se cargaron los liposomas con pinocembrina y/o colesterol, éstos fueron añadidos al DPPC al inicio de la preparación para obtener una concentración aproximada de 2.5 mM. Las concentraciones reales obtenidas se muestran en la tabla 4.1. En cada caso se colocaron las cantidades necesarias de los componentes correspondientes en el matraz bola y se agregó diclorometano para disolver, se agitó mecánicamente hasta ver una sola fase. Después se conectó el matraz al rotavapor y se ajustó a 60 rpm en baño maría durante 45 min hasta evaporar todo el disolvente y obtener una película que queda pegada a las paredes del matraz. Se realiza la hidratación de la película agregando agua destilada y desionizada a una temperatura aproximada de 50°C (es decir, por arriba de su temperatura de transición) y se agita mecánicamente para disolver por completo la película y finalmente se colocó el matraz en el sonicador por 15 minutos para dispersar uniformemente las nanopartículas.

Con la finalidad de obtener liposomas unilamelares de un tamaño uniforme, se realiza la extrusión en un baño maría a temperatura aproximada a 50°C, se hace pasar por un filtro de 100 nanómetros de policarbonato utilizando gas nitrógeno para suministrar la presión necesaria. En cada caso se hicieron 10 extrusiones.

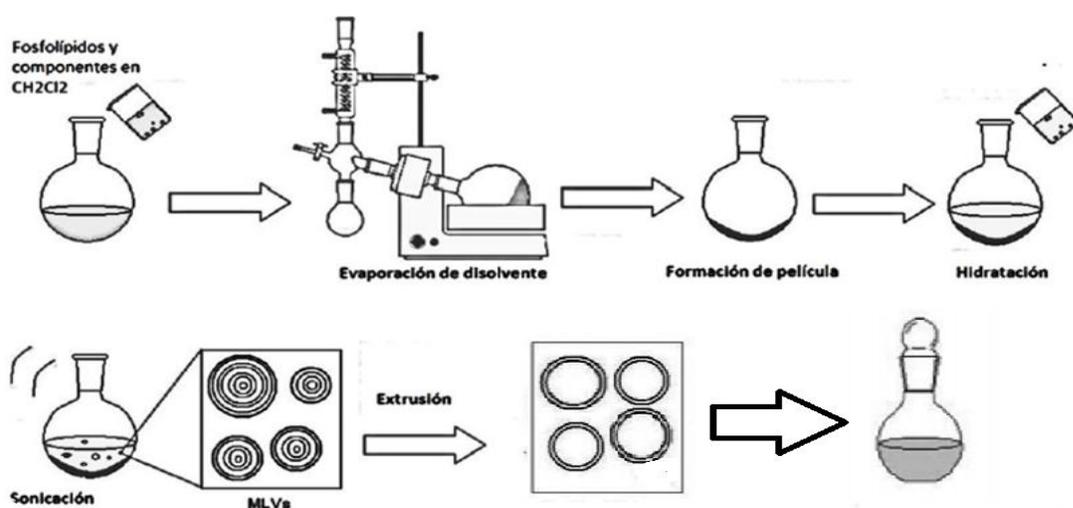


Figura 4.1 Método de hidratación de película delgada y métodos de reducción de tamaño (Araújo Lopes et al., 2013).[27]

4.4 Caracterización termodinámica de los sistemas liposomales por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Material y equipo.

El material necesario fue una jeringa para DSC, vaso de precipitados, sanitas, tubos Ependorf, tubos falcon. El equipo que se ocupó fue un Calorímetro Diferencial de Barrido. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo VP_DSC Microcalorimeter. No serie 06.99.138. USA y un desgasificador. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo ThermoVac2. No serie 08.00.191. USA.

Metodología.

Primero se obtuvo la línea base, para esto se desgasificó el agua desionizada y con una jeringa se inyectó el agua en ambas celdas (una de referencia y otra de muestra). Se llenaron las celdas a un mismo volumen. Fue importante asegurarse de que no hubiera presencia de burbujas en las celdas. Después se ajustaron los parámetros que se utilizaron durante los experimentos. Se dejó correr el programa en el intervalo de temperaturas que se fijó. Luego de obtener la línea base, se inyectó la muestra y se midió con los mismos parámetros. Una vez que se terminó de usar el equipo se lavó abundantemente solamente con agua desionizada.

Los datos para realizar el experimento se cargan al programa Origin8.5® para realizar un experimento de DSC. Éste es el programa correspondiente a la obtención del termograma del sistema DPPC en agua 10 Mm. En este caso se hicieron 3 corridas de 15 a 65 °C a 90 °C/hr, esperando 5 minutos entre una y otra corrida. El análisis de los resultados permite obtener los parámetros termodinámicos ΔH , ΔS , $T_{1/2}$ y T_m .

4.5 Determinación de estabilidad de los sistemas liposomales por técnicas dispersivas de luz (DLS).

Material y equipo.

Se utilizaron tubos ependorf, piseta, celda de plástico para medir tamaño de partícula y celda de plástico para medir potencial Z, papel antipelusa y vaso de precipitados. El equipo que se usó fue un Nanosizer ZS ZEN(3600) de Malvern instruments Ltd, Marvern, UK.

4.5.1 Tamaño de partícula.

Metodología

El tamaño de partícula y su distribución como índice de polidispersividad (PDI) se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) a 25°C. Se colocó la suspensión en la celda hasta la marca que indica el equipo, en la posición adecuada y se ajustaron los parámetros en el software Zetasizer®. La muestra se iluminó con un láser rojo He-Ne a 633 nm, la intensidad de la luz dispersada se midió mediante el detector colocado a 173°. Se utilizó como referencia la lecitina con un índice de refracción de 1.490 y el material dispersante fue agua con viscosidad de 0.8872 e índice de refracción de 1.33. La ecuación de Stokes-Einstein se usó para obtener el diámetro hidrodinámico promedio de los liposomas a partir del coeficiente de difusión ponderado por intensidad. Se realizaron tres mediciones por muestra. Los tamaños de partícula fueron determinados el día que se hidrató la película y posteriormente cada 5 días hasta que se presentó la precipitación de los liposomas.

4.5.2 Potencial Z.

El potencial Z solamente se determinó el primer día. Los resultados se reportan en la sección de resultados. Para medir el potencial Z se introduce la muestra con ayuda de una pipeta beral muy lentamente en la celda, evitando la formación de burbujas de aire. Una vez introducida, todo el proceso está controlado mediante un programa y ajustando los parámetros necesarios como son: el índice de refracción y la absorción que se produce en la disolución a estudiar, la viscosidad y la constante dieléctrica del disolvente empleado (agua, en este caso), la temperatura de trabajo (25 °C), el potencial aplicado, el número de medidas a realizar y la función de Henry, $f(k_D a)$, de las partículas estudiadas, que por defecto está establecida en 1.5, es decir, en el límite de Smoluchowski. El potencial zeta se obtiene como un promedio estadístico de n medidas independientes, que el programa almacena automáticamente.

4.6 Determinación de morfología de los liposomas por técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM).

Material y equipo

Se utilizaron tubos ependorf de 2 mL, piseta, papel antipelusa, pipetas beral. El equipo que se usó fue un Microscopio electrónico de barrido multifuncional JEOL JSM-5900-LV, resolución: 0.3 nm (SEI) HV / 0.5 NM (BEI) LV, amplificación: 18x-300000x.

Metodología

Una vez que se obtuvo el sistema liposomal se diluyó la muestra agregando una gota de la pipeta beral y llevando a 2 mL, con agua destilada y desionizada, posteriormente se toma 1 mL y se lleva a 2 mL. Después se realizó una limpieza

de la superficie que se observó, en la cual se colocó una película delgada en la superficie y se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seca, se recubrió con oro. Se observó a Ultra Alto vacío.

4.7 Determinación de morfología de los liposomas por técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Material y equipo.

Se utilizaron tubos ependorf de 2 mL, piseta, papel antipelusa, pipetas beral. El equipo que se usó fue un Microscopio electrónico de transmisión multifuncional JEOL JEM-2010, resolución: 0.14 nm, amplificación: 3000-1500k.

Metodología.

Con la disolución que se preparó para la obtención de SEM, se utilizó para TEM. La preparación de la muestra es una de las etapas más importantes del procedimiento experimental. Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesaria que ésta sea delgada, es decir, transparente a los electrones, como máximo de 100 nm para que la calidad de las imágenes sea buena. Después de pasar los electrones a través de la muestra, los que son dispersados son recogidos por un objetivo. De esta forma, la imagen se forma y con sistemas de lentes adicionales posibilita una imagen mejorada. Se utiliza un recubrimiento muy delgado de oro. Se observó a ultra alto vacío.

4.8 Caracterización termodinámica de la determinación de concentración de saturación de la bicapa lipídica.

Para determinar la concentración de la bicapa lipídica se formaron liposomas de DPPC y se encapsularon diferentes concentraciones de PINO, las

concentraciones reales usadas en cada experimento se reportan en la tabla 4.2. Para la formación de cada liposoma se siguió la misma metodología que en la sección 4.3 y para la caracterización termodinámica de los diferentes sistemas liposomales por DSC se siguió lo mismo que en la sección 4.4.

Tabla 4.2 Concentraciones reales utilizadas para los diferentes sistemas liposomales para determinar la concentración de saturación de la membrana

PINO	PINO	DPPC
mg mL ⁻¹	mM	mM
0	0	9.694
0.102	0.4028	10.36
0.1414	0.5584	10.32
0.222	0.8766	10.01
0.332	1.296	9.967
0.464	1.811	9.997
0.608	2.373	10.2

4.9 Determinación de la eficiencia de encapsulación de pinocembrina en liposomas de DPPC.

4.9.1 Curva patrón de pinocembrina en etanol.

Material y equipo

Se utilizaron tubos Ependorf, una micropipeta de 1000 μ L, una micropipeta de 200 μ L, puntas para cada micropipeta, tubos falcon, viales de 1.5 y 2 mL, espátula y una celda de cuarzo. El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro UV-Visible. Marca Varian. Modelo CARY 50. Australia y una Centrifuga. Marca Hermle Cabortechnict GmbH. Modelo Drehzahl. No serie 2-416198. USA.

Metodología

Primero se obtuvo una curva patrón de pinocembrina para poder determinar la eficiencia de encapsulación en el liposoma. Se preparó una disolución madre pesando la cantidad necesaria para tener una concentración 0.1 mg mL^{-1} , para eso se pesaron 0.00118 g de pinocembrina y se disolvieron en 5 mL de etanol, luego se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó.

Después se realizaron una serie de diluciones, que presentaran una absorbancia de 0.2 a 1 aproximadamente en un rango de longitud de onda entre 200 nm y 400 nm . Se observó que la pinocembrina absorbe a 290 nm aproximadamente. Se hicieron diluciones por triplicado de la solución madre en etanol utilizando micropipetas. La tabla 4.3 muestra cómo fueron preparadas dichas diluciones.

Tabla 4.3 Volúmenes medidos para la curva patrón

μL de dilución madre	μL Etanol	Volumen final en viales
25	975	1 mL
50	950	1 mL
75	925	1 mL
100	900	1 mL
125	875	1 mL

4.9.2 Método de centrifugación para determinar %EE.

Material y equipo.

Se utilizaron tubos Ependorf, una micropipeta de $1000 \mu\text{L}$, una micropipeta de $200 \mu\text{L}$, puntas para cada micropipeta, tubos falcon, viales de 1.5 y 2 mL , espátula y una celda de cuarzo. El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro UV-Visible.

Marca Varian. Modelo CARY 50. Australia y una Centrifuga. Marca Hermle Cabortechinict GmbH. Modelo Drehzahl. No serie 2-416198. USA.

Metodología.

Para calcular la eficiencia de encapsulación de PINO en liposomas de DPPC, se tomaron alícuotas de 1 mL de los liposomas de DPPC:PINO con concentraciones de PINO de 0.4028, 0.5584, 0.8766 y 2.373 mM y DPPC:CHOL:PINO por duplicado en viales de 1.5 mL. Luego se colocaron en la centrifuga por 7 horas y media en ciclos de 30 minutos a 15000 rpm y 25 °C. Después de este tiempo se tomaron 50 µL del sobrenadante y se disolvieron en 950 µL de etanol, se ajustaron los parámetros en el programa del equipo del UV-Visible donde se realizaron lecturas de longitud de onda de 200 a 400 nm, se leyó el blanco (etanol) para corregir por línea base y se midió la absorbancia de las muestras. Posteriormente se realizó una extrapolación para determinar la absorbancia a concentración cero, que está relacionada la cantidad de PINO que no se encapsuló, y haciendo una diferencia, se calcula la eficiencia de encapsulación.

4.9.3 Método de precipitación de liposomas con un agente coagulante (protamina) para determinar %EE.

Material y equipo.

Se utilizaron tubos Ependorf, una micropipeta de 1000 µL, una micropipeta de 200 µL, puntas para cada micropipeta, tubos falcon, viales de 1 y 2 mL, espátula y una celda de cuarzo. El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro UV-Visible. Marca Varian. Modelo CARY 50. Australia y una Centrifuga. Marca Hermle Cabortechinict GmbH. Modelo Drehzahl. No serie 2-416198. USA.

Metodología.

Para calcular la eficiencia de encapsulación de PINO en liposomas de DPPC de diferentes concentraciones de PINO que fueron de 0.4028, 0.5584 y 0.8766 mM, se tomaron alícuotas de 1 mL de los liposomas por duplicado en viales de 1.5 mL. Primero se preparó una solución madre de protamina de la siguiente manera, se pesó 0.12522 g de protamina y se disolvió con agua destilada y desionizada, después se pasó a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 mL de la muestra liposomal y se agregaron 20 μ L de protamina y se centrifugó por 6 minutos a 6000 rpm y 25°C. Después se tomaron 50 μ L del sobrenadante y se disolvieron en 950 μ L de etanol, se ajustaron los parámetros en el programa del equipo del UV-Visible donde se realizaron lecturas de 200 a 400 nm, se leyó el blanco (etanol) para corregir por línea base y se midió la absorbancia de las muestras. Posteriormente con la curva patrón de pinocembrina, se realizó una extrapolación para determinar la absorbancia a concentración cero, que está relacionada la cantidad de PINO que no se encapsuló, y haciendo una diferencia, se calcula la eficiencia de encapsulación.

4.9.4 Método con filtros Amicon® Ultra para determinar %EE.

Material y equipo

Se utilizaron filtros para centrífuga de marca Amicon Ultra de volumen de 0.5 mL y un poro de 10kDa, también se utilizaron tubos Ependorf, micropipeta de 1000 μ L y de 200 μ L, puntas para cada micropipeta, tubos falcon, viales de 1.5 y 2 mL, espátula y una celda de cuarzo. El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro UV-Visible. Marca Varian. Modelo CARY 50. Australia y una Centrifuga. Marca Hermle Cabortechinict GmbH. Modelo Drehzahl. No serie 2-416198. USA.

Metodología.

Para calcular la eficiencia de encapsulación de PINO en liposomas de DPPC, se utilizaron 3 mL de muestra y de ésta se tomaron alícuotas de 500 μ L, se colocaron en los filtros, luego se centrifugaron por 25 min a 15000 rpm y 25 °C. Se recolectó el filtrado y se tomaron 500 μ L del filtrado y se disolvieron en 500 μ L de etanol se ajustaron los parámetros en el programa del equipo UV-Visible donde se realizaron lecturas de 200 a 400 nm, se leyó el blanco (etanol) para corregir por línea base y se midió la absorbancia de las muestras. Posteriormente se determinó la eficiencia de encapsulación como en el caso anterior.

5 Resultados y Discusión.

5.1 Sistema liposomal de DPPC.

5.1.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC.

La preparación de los liposomas fue por “hidratación de película delgada” la concentración real de DPPC fue de 9.69 mM, posteriormente fue caracterizado por Calorimetría Diferencial de Barrido y los resultados se pueden ver en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Resultados termodinámicos de los liposomas de DPPC caracterizado por DSC.

Liposoma	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ / \text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$
DPPC	40.72 ± 0.04	5.25 ± 0.07	16.72 ± 0.00	1.00 ± 0.00

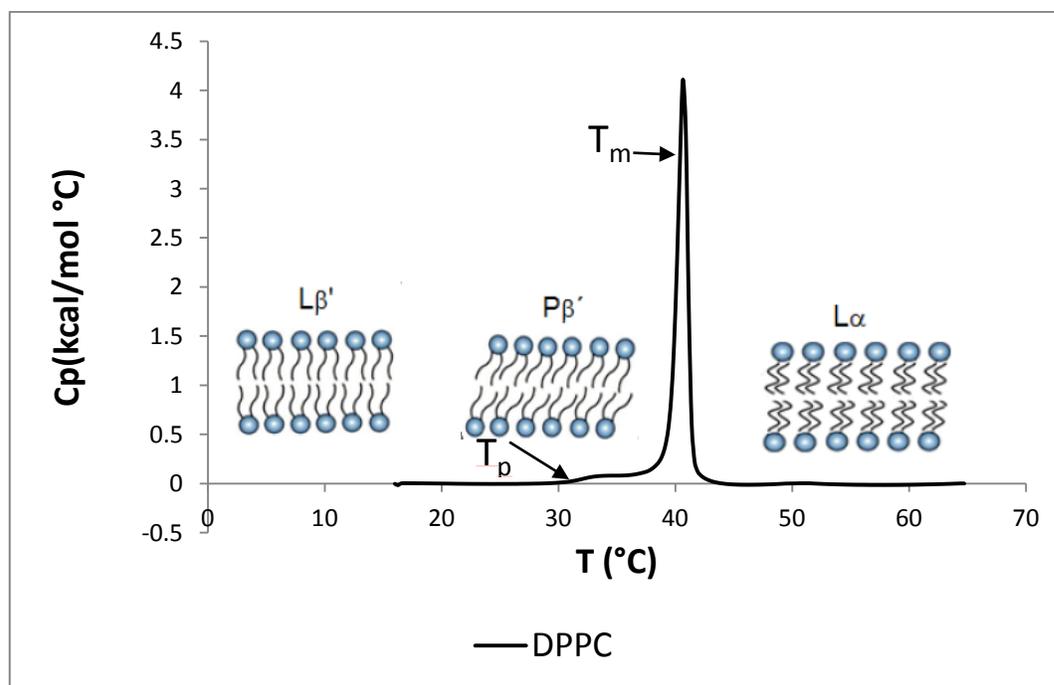


Figura 5.1. Termograma del liposoma DPPC.

Tabla 5.2 Datos termodinámicos de la literatura del liposoma de DPPC.

Referencias	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ / \text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
Rodney (1993) ²⁰	37.2 ± 0.10	5.5 ± 0.50	17.72
Salinas (2014) ³⁶	40.87	5.34	17.00
Martínez (2016) ¹²	40.85	5.16	16.43

El primer experimento consistió en elaborar liposomas de DPPC para el cual los datos están reportados en literatura y también fueron comparados con los resultados obtenidos con anterioridad por otros compañeros en el mismo laboratorio (Tabla 5.2). En la figura 5.1 se ve el termograma que se obtuvo a partir de la técnica calorimétrica, donde se aprecian las tres fases: fase gel $L\beta'$; fase ondulada $P\beta'$; y la fase líquida-cristalina o fase fluida. Se muestran las transiciones de fase: la pre-transición T_p que corresponde a la transición de la fase gel a la fase ondulada; la transición principal $T_m = 40.72 \pm 0.04$ ($^\circ\text{C}$) que corresponde al cambio de la fase ondulada a la fase fluida. En la tabla 5.1 se reportan los datos termodinámicos que se obtuvieron experimentalmente, donde el $\Delta H^\circ = 5.25 \pm 0.07$ (kcal mol^{-1}) y este valor corresponde a la energía necesaria para que ocurra el cambio de fase y se obtiene calculando el área bajo la curva mediante el programa OriginPro8.5®. La $T_{1/2} = 1.00 \pm 0.00$ ($^\circ\text{C}$), es un valor muy pequeño lo cual está asociado con un pico angosto en la figura 5.1, lo cual se debe a la alta pureza del liposoma. También se calculó el $\Delta S^\circ = 16.72 \pm 0.00$ ($\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) lo cual indica un aumento en el desorden del sistema al pasar de la ondulada a la fase líquido-cristalina. El ΔS° se obtiene a partir de que se considera que en la T_m , el sistema está en equilibrio, en esta temperatura el liposoma se encuentra en un 50 % como fase ondulada y un 50 % como fase líquido-cristalina, por lo tanto el ΔG° es igual a cero. En consecuencia

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T_m \Delta S^\circ \quad ; \quad 0^\circ = \Delta H^\circ - T_m \Delta S^\circ \quad ; \quad \Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T_m}$$

La diferencia entre los datos obtenidos en este trabajo y los datos reportados por Rodney pueden provenir de diferentes factores: el equipo utilizado en este trabajo

es más moderno y el fosfolípido de más alta pureza. Los resultados de Salinas y Martínez fueron obtenidos en el mismo laboratorio con el mismo equipo pero diferente lote de fosfolípido. En la tabla 5.2 se observa que los datos son muy cercanos uno del otro, por lo tanto el método fue reproducible.

5.1.2 Dispersión dinámica de la Luz de DPPC.

Tamaño de Partícula.

El equipo Nanosizer ZS ZEN(3600) que se utilizó para la medición de tamaño de partícula arrojó gráficas de tamaño de partícula en nm que se analiza con el programa zetasizer®. Para el sistema liposomal de DPPC se midió tamaño de partícula a lo largo de 20 días, transcurridos los cuales, se presentó la separación en dos fases.

Se puede observar en la figura 5.2 y en la tabla 5.3 que para el día 1 se presenta un solo pico y la distribución gaussiana es pequeña, lo cual significa que hay una población con una pequeña polidispersión. El tamaño de partícula obtenido es de 104.7 ± 1.2 nm. La medición de tamaño de partícula fue realizada por triplicado obteniendo resultados similares. Al paso del tiempo se presenta un pequeño aumento en el tamaño de la partícula y la polidispersidad. En el día 20 (figura 5.2) ya se aprecia la aparición de una segunda población, indicando una aglomeración de los liposomas obtenidos originalmente.

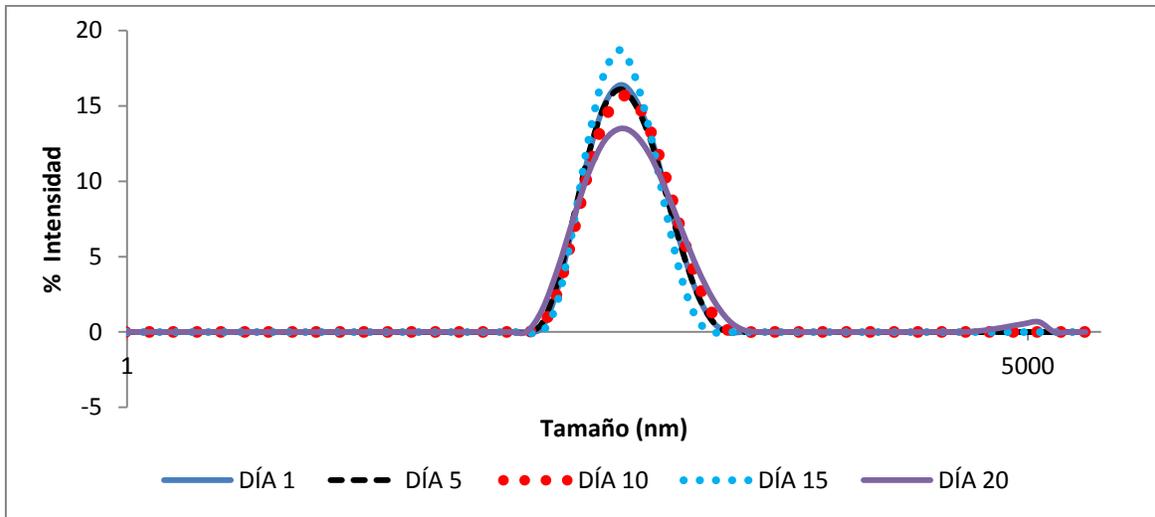


Figura 5.2 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC del día 1 al día 20.

Tabla 5.3 Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC

Día	Sistema DPPC Tamaño de partícula / nm	PDI
1	104.70 ± 1.20	0.10 ± 0.02
5	106.20 ± 1.10	0.11 ± 0.02
10	109.40 ± 1.70	0.15 ± 0.04
15	106.90 ± 1.30	0.16 ± 0.02
20	111.30 ± 1.00	0.18 ± 0.01

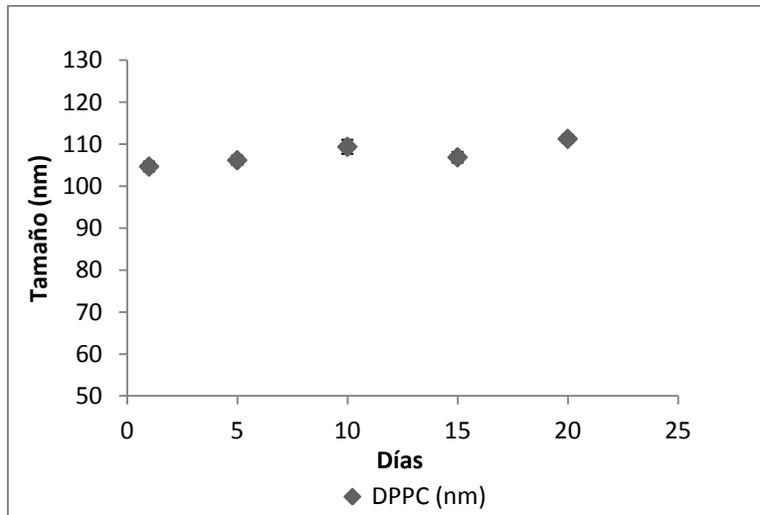


Figura 5.3 Gráfica de medición de tamaño de partícula del sistema liposomal DPPC.

Potencial Z.

El potencial Z se midió en el equipo Nanosizer ZS ZEN(3600). El primer día el equipo arrojó una gráfica de distribución gaussiana (figura 5.4). En la tabla 5.4 se reporta el dato numérico de potencial. Un resultado mayor a +30mV, o menor a -30 mV indica que el sistema es estable, mientras que un valor cercano a 0 indica que el sistema es inestable. Al obtener un valor tan cercano a 0 se espera que el sistema empiece a flocular después de pocos días, lo cual sucedió a los 20 días.

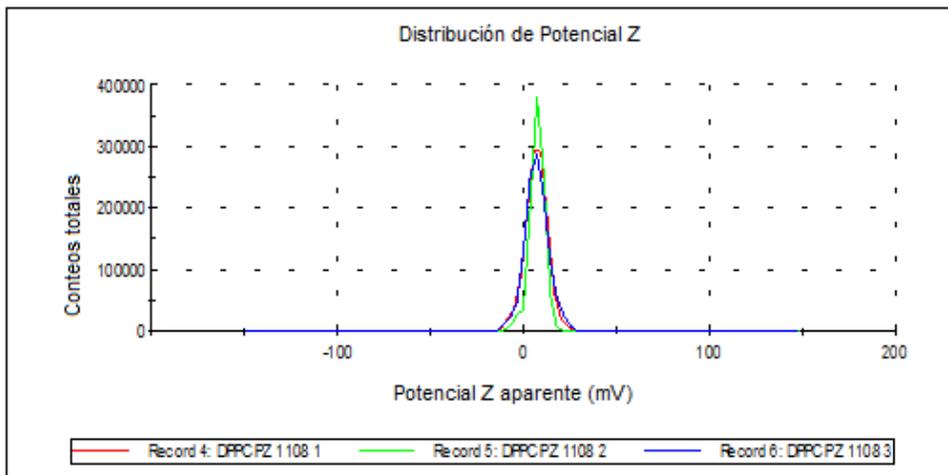


Figura 5.4 Gráfica de potencial Z (mV) del sistema liposomal DPPC.

Tabla 5.4 Resultado de potencial Z del sistema liposomal DPPC

LIPOSOMA	POTENCIAL Z
DPPC	7.02 ± 0.10 mV.

5.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC.

Para determinar la morfología y la lamelaridad de los liposomas de DPPC puro se utilizaron los métodos de TEM y SEM. Se observó en la figura 5.5 en la SEM que los liposomas presentan una forma esferoide y de un tamaño aproximado 100 nm, también se observó que hay formación de conglomerados de liposomas, esto se debe a que la medición se realizó después del tiempo de estabilidad que se determinó con DLS. En la TEM no se logró apreciar a simple vista la lamelaridad de los liposomas debido a que hay más conglomerados de liposomas y la muestra ya no es estable. En la figura 5.5 (d, e y f), los puntos negros son atribuidos a los liposomas y éstos son de tamaño aproximado a 100 nm y son unilamelares.

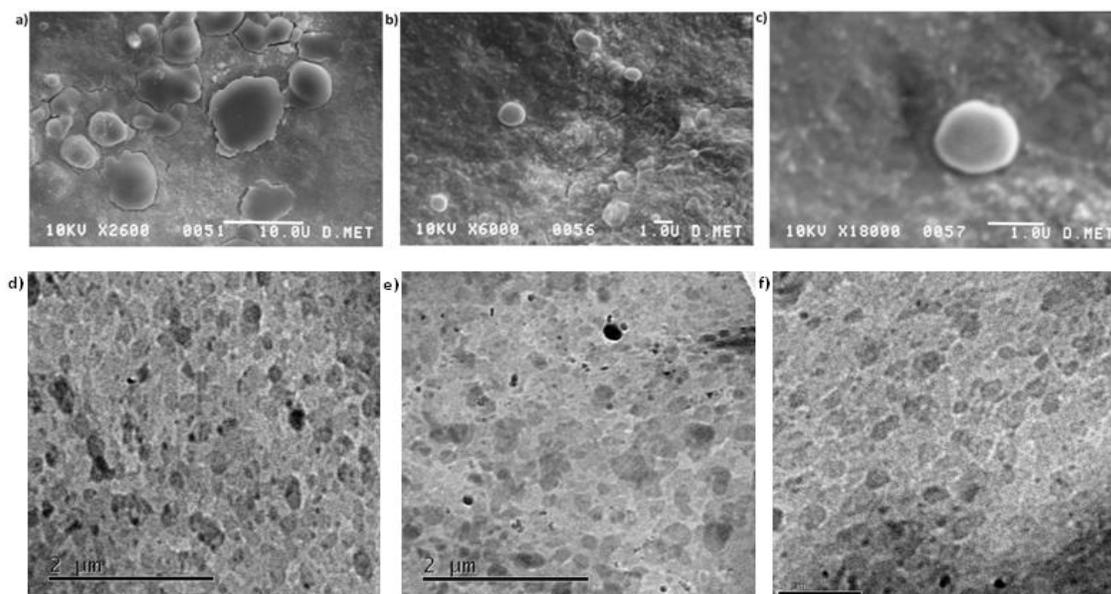


Figura 5.5 Microscopia electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC.

5.2 Sistema liposomal DPPC:CHOL.

5.2.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC: CHOL.

Las concentraciones reales para la preparación de liposomas de DPPC: CHOL fueron de 9.8 mM y 2.485 mM respectivamente, posteriormente se caracterizó el sistema liposomal y los datos se reportan a continuación.

Tabla 5.5 Resultados termodinámicos de los liposomas de DPPC: CHOL caracterizado por DSC.

Liposoma	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ / \text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$
DPPC:CHOL	40.14 ± 0.72	4.07 ± 0.51	12.99 ± 0.01	7.43 ± 0.28

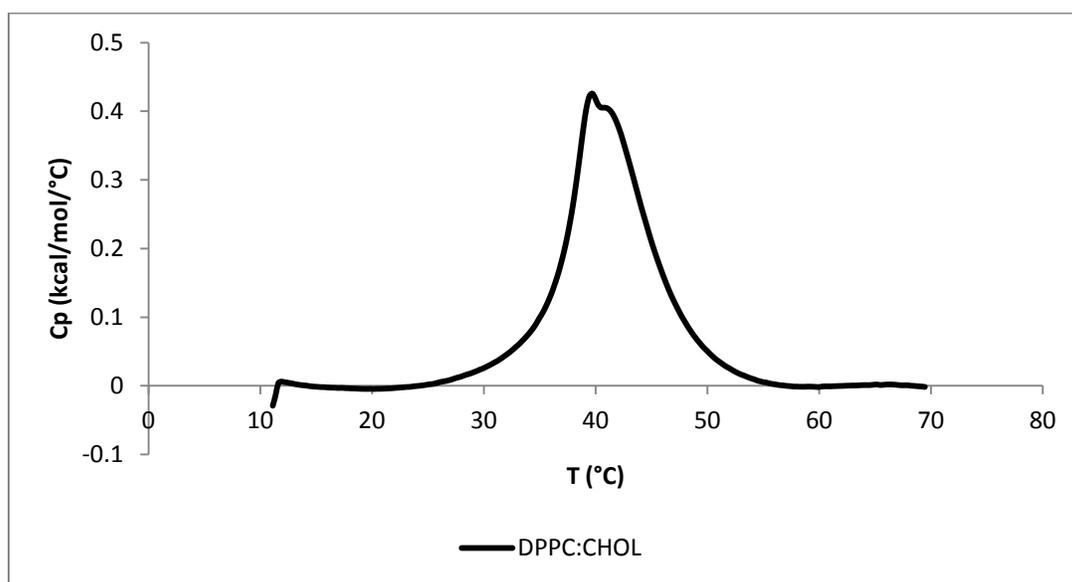


Figura 5.6 Termograma DSC del sistema DPPC: CHOL.

Para el sistema donde se incorpora colesterol al liposoma de DPPC los fosfolípidos están ordenados y mayormente extendidos al asociarse con el colesterol, por lo que las moléculas tienen una alta movilidad rotacional y lateral.

Al añadir colesterol a la bicapa lipídica, provoca que aumente la densidad en la sección hidrofóbica. Además el colesterol inhibe la cristalización de las cadenas alquílicas para pasar de la fase ondulada a la fase L_{α} , esto se debe a la formación de dominios de colesterol en dicha fase (Colesterol libre-fase L_{β} <----> Dominios de colesterol- fase L_{α}). En la figura 5.6 se pudo observar que la fase de pretransición desaparece en este sistema debido a que ya no hay un cambio de fase gel a fase ondulada y también se puede ver que el pico del termograma se ensancha, debido a la presencia del colesterol en la bicapa lipídica. El ΔS° tiene un valor positivo lo que significa que el sistema está desordenado y se requiere administrar poca energía para que haya una transición de fase.

DECONVOLUCIÓN

Fue necesario realizar la deconvolución para el sistema liposomal de DPPC: CHOL, ya que se observa una traza calorimétrica con dos picos debido a la presencia de dominios de colesterol. Este proceso se realizó mediante el uso del programa OriginPro8.5® el cual hace un análisis de las curva gaussianas múltiples. En este caso los dos picos obtenidos fueron los que se observan en líneas punteadas en la figura 5.7.

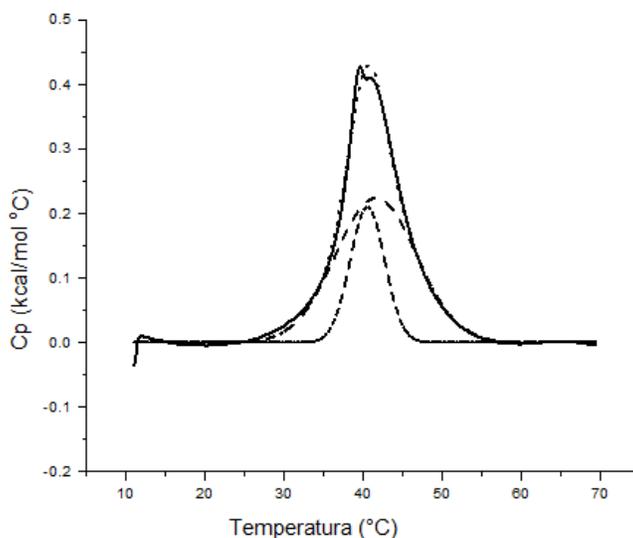


Figura 5.7 Termograma DSC del sistema DPPC: CHOL. (Línea sólida). Curvas deconvolucionadas (líneas punteadas).

Tabla 5.6. Resultados termodinámicos de deconvolución de los liposomas de DPPC:CHOL caracterizado por DSC.

Dominio	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{cal/mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$
Pobre en CHOL	40.41 ± 0.19	0.95 ± 0.20	3.02 ± 0.63	4.02 ± 0.06
Rico en CHOL	41.56 ± 0.10	2.85 ± 0.27	9.06 ± 0.87	9.42 ± 0.66

A partir de este análisis se obtuvieron los diferentes parámetros termodinámicos de cada pico los cuales se pueden ver en la tabla 5.6. La T_m difiere de 1.15 °C un pico del otro. El dominio rico en colesterol es aquél que presenta un $T_{1/2}$ mayor porque la presencia de colesterol aumenta el número de microestados probables del sistema, es decir, un ΔS° mayor, y por consiguiente un ΔH° mayor, esto es, se necesita mayor energía para la transición. En la figura 5.8 se representan gráficamente los dominios de colesterol presentes en cada fase. (Tomado de Martínez [12])

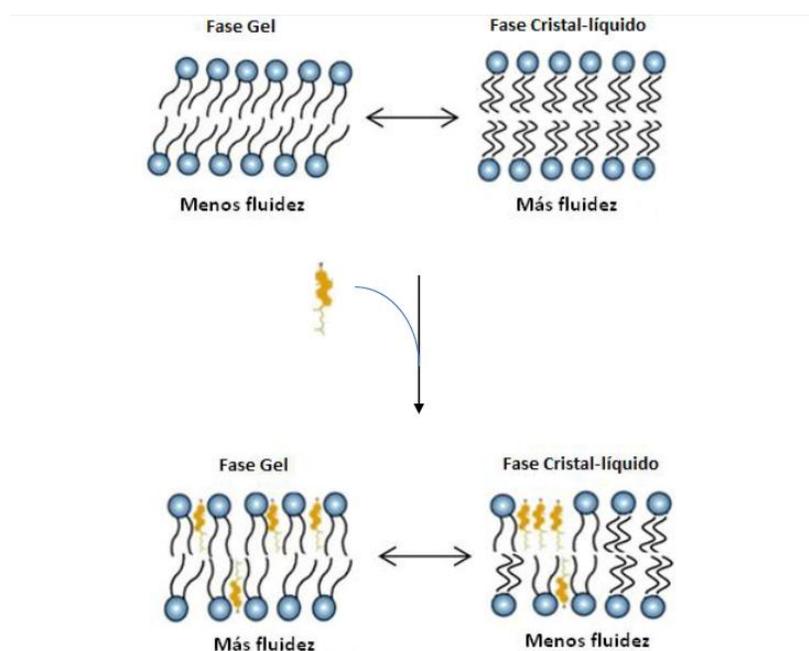


Figura 5.8 Representación de dominios de CHOL para la fase gel y la fase cristal-líquido (Martínez 2016).

5.2.2 Dispersión dinámica de la Luz de DPPC: CHOL.

Tamaño de partícula

Para analizar las gráficas de tamaño de partícula en nm vs intensidad determinados con el equipo Nanosizer ZS ZEN (3600), se utilizó el programa zetasizer®. Para el sistema liposomal de DPPC: CHOL se midió tamaño a lo largo de 15 días, transcurridos los cuales se separa en dos fases. Se puede observar en la figura 5.9, cómo en el caso del DPPC la polidispersividad aumenta a lo largo de los días, y se forma una segunda población a los 15 días.

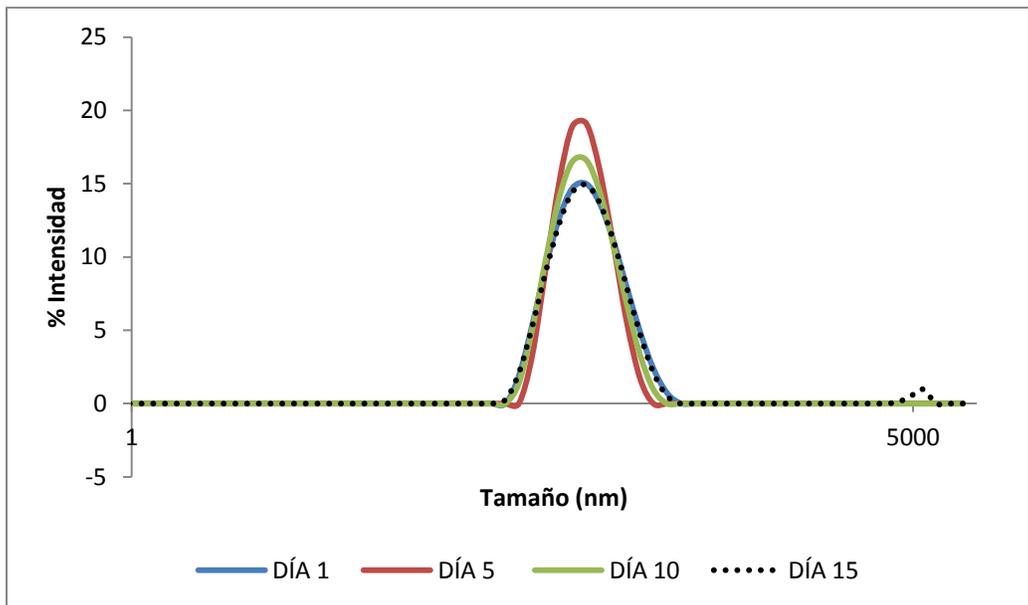


Figura 5.9 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: CHOL del día 1 al día 15.

En la tabla 5.7 se presentan los resultados obtenidos para el tamaño de partícula y PDI para el sistema DPPC: CHOL. El tamaño de los liposomas crece un poco al transcurrir los días, oscilando entre 130 y 140 nm (Figura 5.10). En el día 1 tenemos un sistema con una polidispersividad pequeña y para el día 15 pasa a ser un sistema con una polidispersividad mayor.

Tabla 5.7. Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC: CHOL

Día	Sistema DPPC:CHOL Tamaño de partícula / nm	PDI
1	134.80 ± 0.64	0.11 ± 0.01
5	133.20 ± 0.90	0.12 ± 0.01
10	131.20 ± 1.14	0.12 ± 0.02
15	140.00 ± 1.16	0.19 ± 0.02

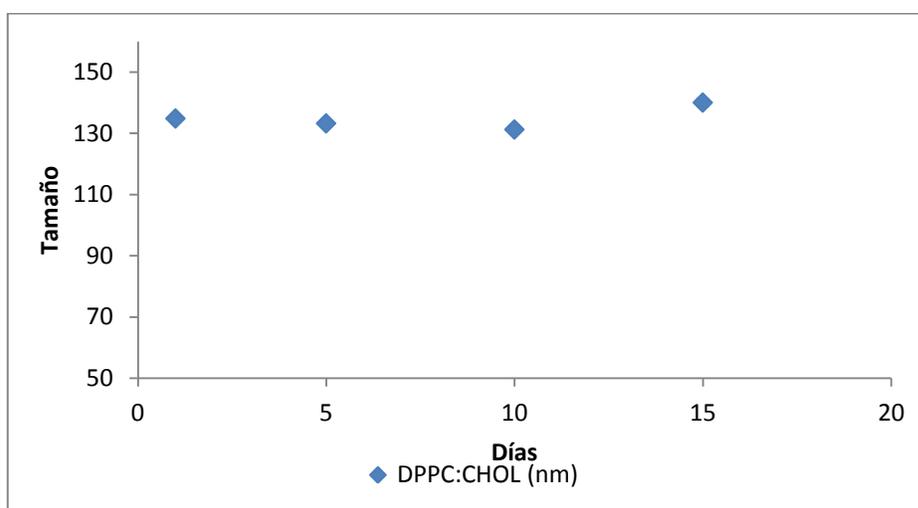


Figura 5.10 Gráfica de variación del tamaño de partícula en función del tiempo del sistema DPPC:CHOL.

Potencial Z.

El potencial Z del sistema DPPC: CHOL obtenido fue de -3.51 ± 0.88 mV. Como este valor está cercano 0 se trata de un sistema inestable, de tal manera, para el día 15 se sedimentaron los liposomas presentando dos fases. En la figura 5.11 se presenta la gráfica de distribución Gaussiana para el mismo sistema.

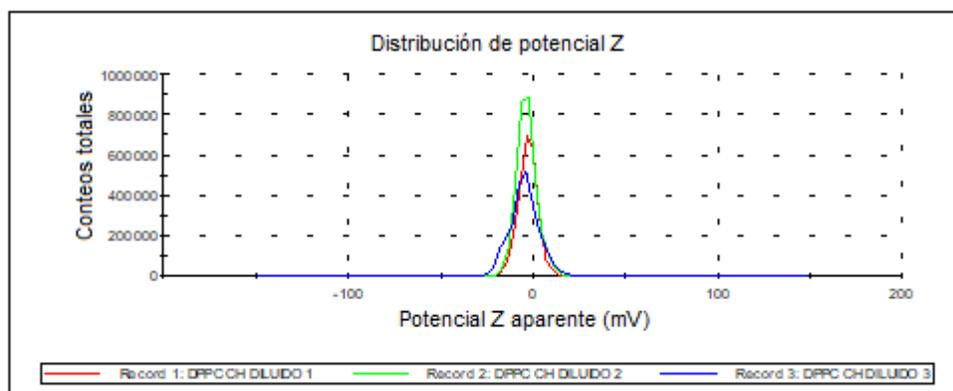


Figura 5.11 Distribución gaussiana de potencial Z en mV del sistema liposomal DPPC: CHOL.

5.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC: CHOL.

En la figura 5.12 se observa la SEM (a, b y c) de los liposomas formados de DPPC: CHOL. Éstos tienen una forma esferoide y son de un tamaño aproximado de 100 nm con polidispersividad pequeña. En la TEM (d, e y f) se observa claramente que son unilamelares por lo tanto el método de extrusión para homogeneizar la muestra fue exitoso. Las microscopías obtenidas son muy claras debido a que este sistema es bastante estable.

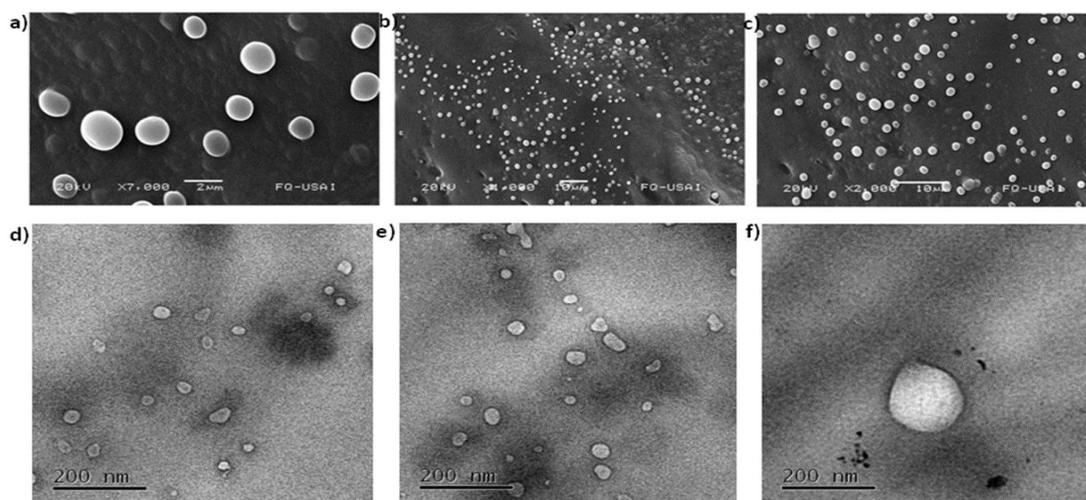


Figura 5.12 Microscopía electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC: CHOL.

5.3 Sistema liposomal DPPC: PINO.

5.3.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC: PINO.

Se prepararon dos sistemas liposomales de DPPC: PINO de concentraciones diferentes, A y B, donde la concentración A es menor que en B. Los sistemas liposomales se caracterizaron por DSC obteniendo trazas calorimétricas para cada uno (Figura 5.13). Los parámetros termodinámicos obtenidos están resumidos en la tabla 5.8 y se discuten a continuación.

Tabla 5.8. Resultados de parámetros termodinámicos de los liposomas de DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B caracterizado por DSC.

Liposoma	[PINO] / mgmL ⁻¹	T _m / °C	ΔH ^o _{total} / kcal mol ⁻¹	ΔS ^o / cal mol ⁻¹ K ⁻¹	T _{1/2} / °C
DPPC	0	40.72 ± 0.04	5.25 ± 0.07	16.72 ± 0.00	1.00 ± 0.00
DPPC:PINO A	0.608	33.17 ± 0.10	5.30 ± 0.61	17.29 ± 0.02	9.52 ± 0.25
DPPC:PINO B	0.742	35.48 ± 0.11	5.48 ± 0.28	17.76 ± 0.92	10.69 ± 0.14

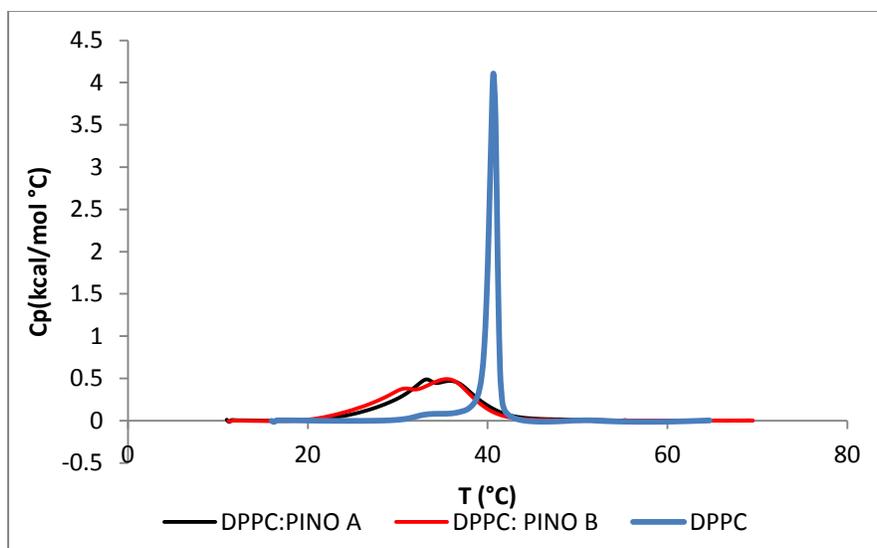


Figura 5.13 Termograma DSC de los sistemas DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B.

En la figura 5.13, se comparan las trazas calorimétricas, se puede ver que la incorporación de PINO a la bicapa lipídica tuvo como consecuencia que desapareciera la temperatura de pre-transición T_p , temperatura asociada a la interacción con las cabezas polares del liposoma.

El valor de $T_{1/2}$ muestra una tendencia a aumentar (tabla 5.8), ya que al aumentar la concentración de las moléculas agregadas, éstas se incorporan a la bicapa lipídica causando el ensanchamiento del pico a media altura.

La temperatura de transición principal (T_m) se recorrió a temperaturas más bajas al incorporar diferentes concentraciones de PINO al sistema de DPPC puro.

La traza calorimétrica del DPPC tiene una temperatura de transición principal, observándose sólo un pico angosto. Una vez que se incorpora PINO, aparece un hombro que acompaña a T_m a temperaturas más bajas (figura 5.13). Esta nueva señal representan dominios ricos en PINO y dominios pobres en la misma; por lo tanto, cada dominio tiene una temperatura de transición diferente y necesita que se le administre una energía diferente para que ocurra la transición de fase en cada sección del liposoma. La aparición de dos picos en las trazas calorimétricas se han observado en casos donde se incorpora colesterol a la membrana lipídica y se han estudiado. [18, 35]

Estos 3 sistemas liposomales tuvieron valores parecidos de ΔH°_{total} , es decir, se requiere administrar la misma cantidad de energía para que ocurra la transición de fase (de todo el sistema), tanto para el liposoma puro como para los sistemas con altas concentraciones de PINO. Debido a los resultados obtenidos es necesario analizar cada pico de forma independiente. El estudio se realiza por el método de deconvolución utilizando el software origin 8.5®. El análisis por este método se presenta a continuación.

DECONVOLUCIÓN.

La tabla 5.9 resume las temperaturas de transición principal y el ancho a media altura de la deconvolución, para el sistema puro A y B, para determinar qué pico corresponde a dominios ricos en PINO y pobres en ésta.

Tabla 5.9 Resultados termodinámicos de deconvolución de los liposomas de DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B caracterizado por DSC.

Liposoma	[PINO] / mg mL ⁻¹	T _m / °C		T _{1/2} / °C	
DPPC:PINO A	0.608	33.27 ± 0.19	35.31 ± 0.42	11.71 ± 1.50	6.93 ± 0.34
DPPC:PINO B	0.742	32.26 ± 0.11	36.24 ± 0.03	9.85 ± 0.32	3.59 ± 0.11

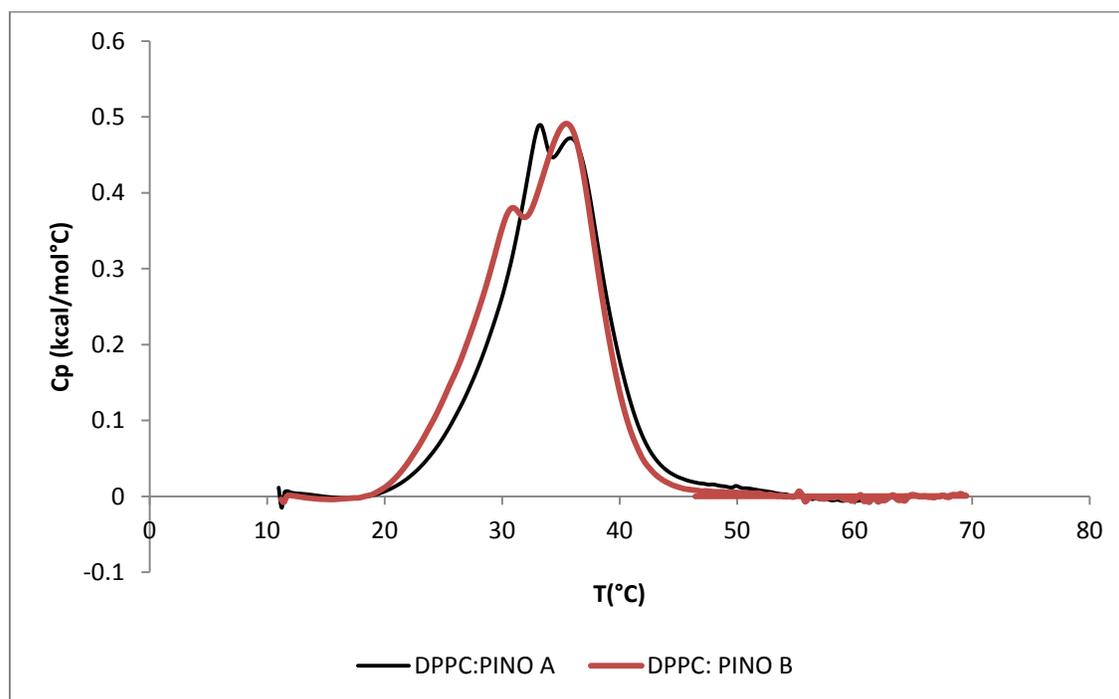


Figura 5.14 Termograma DSC del sistema DPPC: PINO A y DPPC: PINO B.

En la tabla 5.9 se observa que el valor de T_m del hombro y el pico principal, de A y B, a mayores concentraciones de PINO los picos se separan más entre ellos y en la figura 5.14 se aprecia que cambian de forma significativa a pesar de que la diferencia entre concentraciones es pequeña.

La figura 5.15 ejemplifica los sistemas ricos en pinocembrina, DPPC: PINO A (izquierda) y DPPC: PINO B (derecha). En la figura 5.15 a), se observa que hay menos moléculas que en b), esto es porque hay menor concentración de PINO,

hay un dominio rico en pino y algunas moléculas distribuidas en la bicapa lipídica. En la figura 5.15 b), se puede ver que aunque se agregaron más moléculas de PINO, éstas se aglomeran más en el dominio rico en pinocembrina, reforzando esta sección, y se distribuyen menos en el resto de la bicapa lipídica.

En la tabla 5.9 los valores de $T_{1/2}$ para el primer pico (hombro) en ambos sistemas (DPPC: PINO A y DPPC: PINO B) mostraron ser muy parecidos, por lo tanto este dominio de fase se mantiene sin cambio a pesar de aumentar la concentración de PINO; es decir, la cooperatividad no se ve afectada.

En la tabla 5.9, para el caso del segundo pico, $T_{1/2}$ sí se observa una gran diferencia entre el sistema DPPC: PINO A y DPPC: PINO B; a menor concentración de PINO, $T_{1/2}$ disminuye, lo que indica que las moléculas están distribuidas uniformemente en la bicapa lipídica, mientras que a mayores concentraciones, $T_{1/2}$ disminuye aún más, siendo este pico el que es más cooperativo. Esto puede deberse a que al tener una mayor concentración de PINO, el empaquetamiento se refuerza en el dominio rico en PINO, por lo tanto, pocas moléculas se distribuyen en el dominio pobre en PINO; en consecuencia, aumenta la cooperatividad para la transición de fase gel a fase líquido-cristalino.

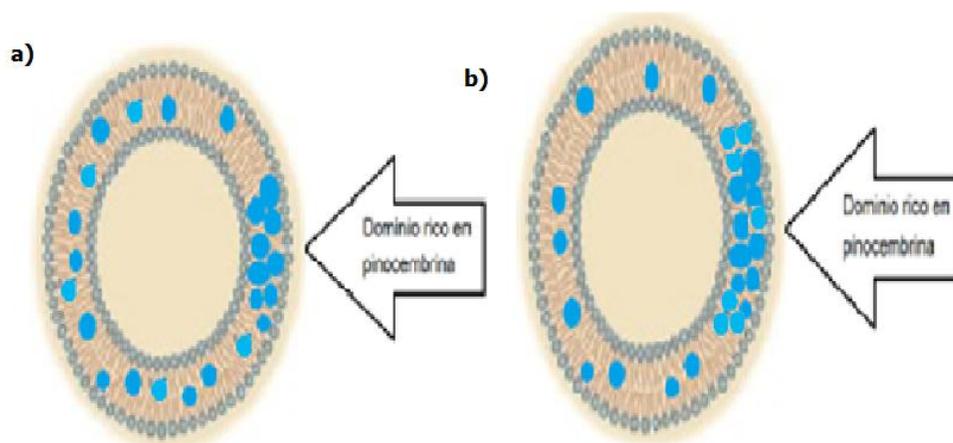


Figura 5.15 En a) se muestra el liposoma de DPPC: PINO A y en b) el liposoma de DPPC: PINO B.

La tabla 5.10 muestra ΔH° y ΔS° para las trazas calorimétricas obtenidas de la deconvolución de ambos sistemas (DPPC: PINO A y DPPC: PINO B). Se observa que para el primer pico (Figura 5.16) ΔH° aumentan al aumentar la concentración de PINO, es decir, esto confirma que la PINO en exceso se incorpora al dominio rico en ésta, lo que quiere decir; que el dominio rico en PINO requiere mayor energía para romper las interacciones que se forman, ya que se forma un arreglo tipo cristal [35]. El abatimiento de ΔH° en el segundo pico indica que probablemente las pocas moléculas de PINO que se incorporaron en este dominio pobre en pino hacen que el sistema esté en un estado más fluido, y por lo tanto se requiere menos energía para cambiar de fase.

Tabla 5.10. Resultados de ΔH° y ΔS° de cada pico obtenido de la deconvolución de los sistemas liposomales DPPC, DPPC: PINO A y DPPC: PINO B.

Liposoma	[PINO] / mg mL ⁻¹	ΔH° / kcal mol ⁻¹		ΔS° / cal mol ⁻¹ K ⁻¹	
		Dominio rico-PINO	Dominio pobre-PINO	Dominio rico-PINO	Dominio pobre-PINO
DPPC: PINO A	0.608	3.44 ± 0.34	1.93 ± 0.45	11.24 ± 1.12	6.26 ± 1.46
DPPC: PINO B	0.742	4.62 ± 0.35	0.92 ± 0.07	15.15 ± 1.14	2.97 ± 0.23

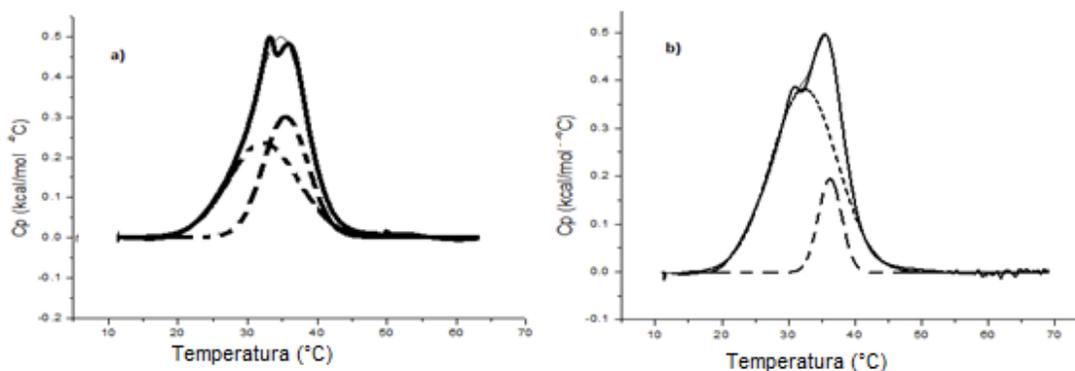


Figura 5.16 Termograma DSC del sistema DPPC: PINO A (a) y DPPC: PINO B (b) (Líneas sólidas). Curvas deconvolucionadas (líneas punteadas).

5.3.2 Dispersión dinámica de la luz de DPPC: PINO.

Tamaño de partícula y potencial Z.

A continuación se presentan los resultados de tamaño de partícula (tabla 5.11 y figura 5.18) del sistema liposomal DPPC: PINO. Se observa que al tener un potencial Z de 3.33 ± 0.58 mV, el sistema es poco estable, sólo se mantuvo por 5 días, y el tamaño de partícula se mantuvo alrededor de 100 nm. En la figura 5.17 a la izquierda se pueden observar las gráficas de distribución gaussiana de tamaño de partícula y a la derecha la apariencia del sistema. En el día uno se ve una sola fase translúcida y al día cinco se torna turbia debido a que los liposomas se están aglomerando pero aún no precipitan.

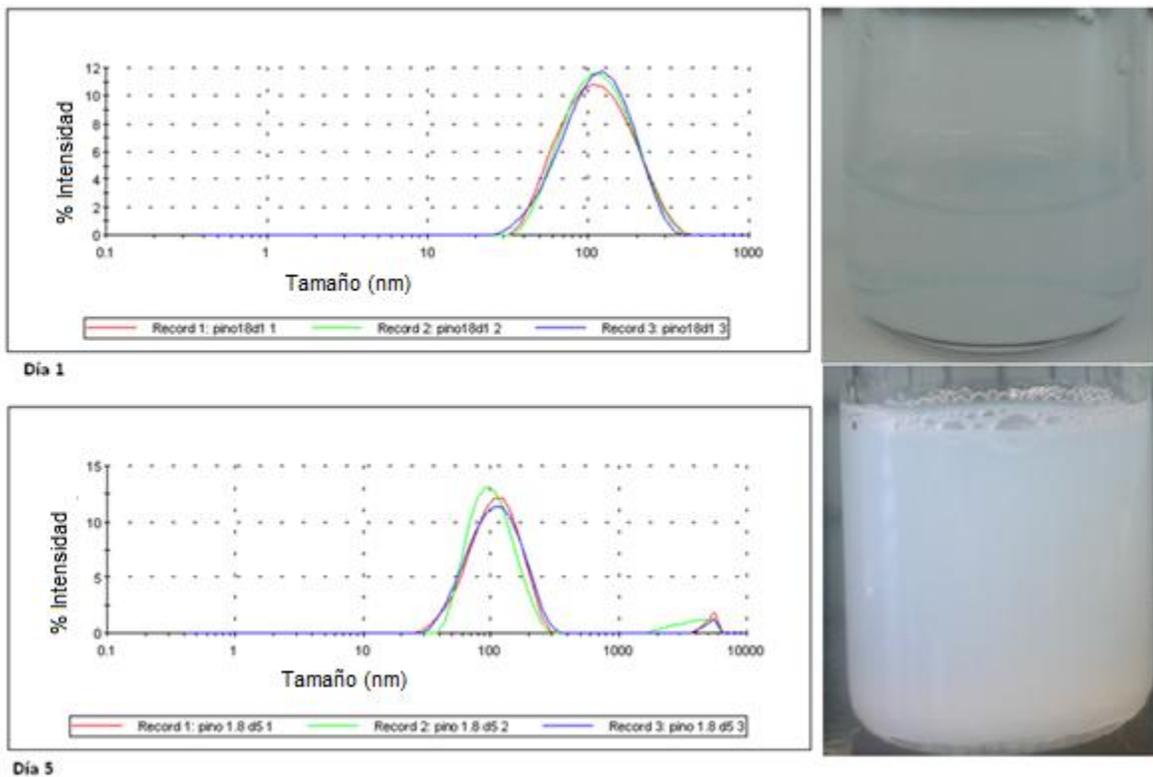


Figura 5.17 Gráficas de distribución gaussiana de tamaño vs intensidad del sistema liposomal de DPPC: PINO a lo largo de 5 días.

Tabla 5.11. Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC: PINO.

Día	Sistema DPPC: PINO Tamaño de partícula / nm	PDI
1	100.80 ± 0.51	0.18 ± 0.01
5	104.90 ± 3.87	0.26 ± 0.02

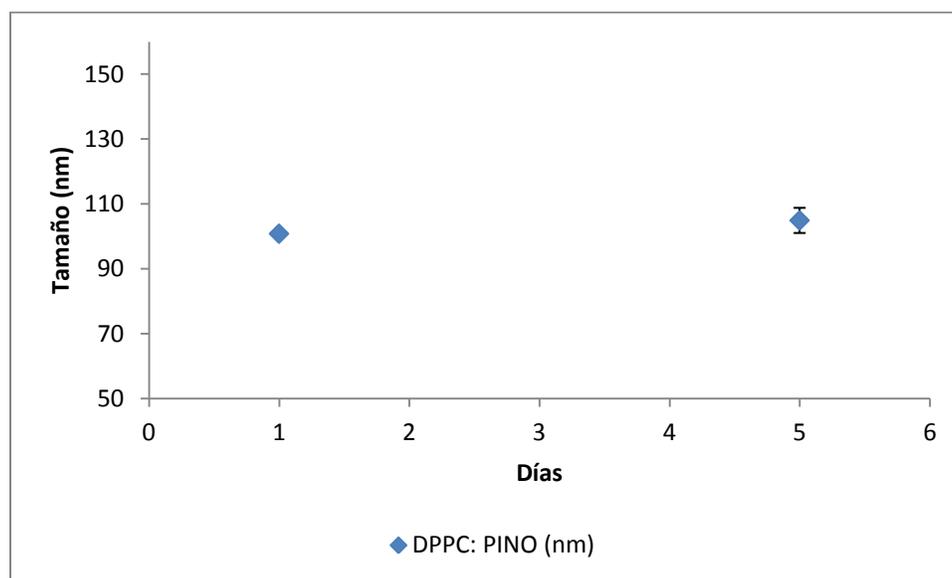


Figura 5.18 Gráfica de medición de tamaño del sistema liposomal DPPC: PINO.

5.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC: PINO.

En la figura 5.19 se observa la SEM (a, b y c) de los liposomas formados de DPPC: PINO. Éstos tienen una forma esferoide y son de un tamaño aproximado de 100 nm con polidispersividad pequeña, la SEM se tomó en los primeros cinco días de la formación de los liposomas, durante los cuales se ven bien definidos. En la figura 5.19 se ve la TEM (d, e y f) de los liposomas después de lo cinco días de su formación y se puede ver que están aglomerándose.

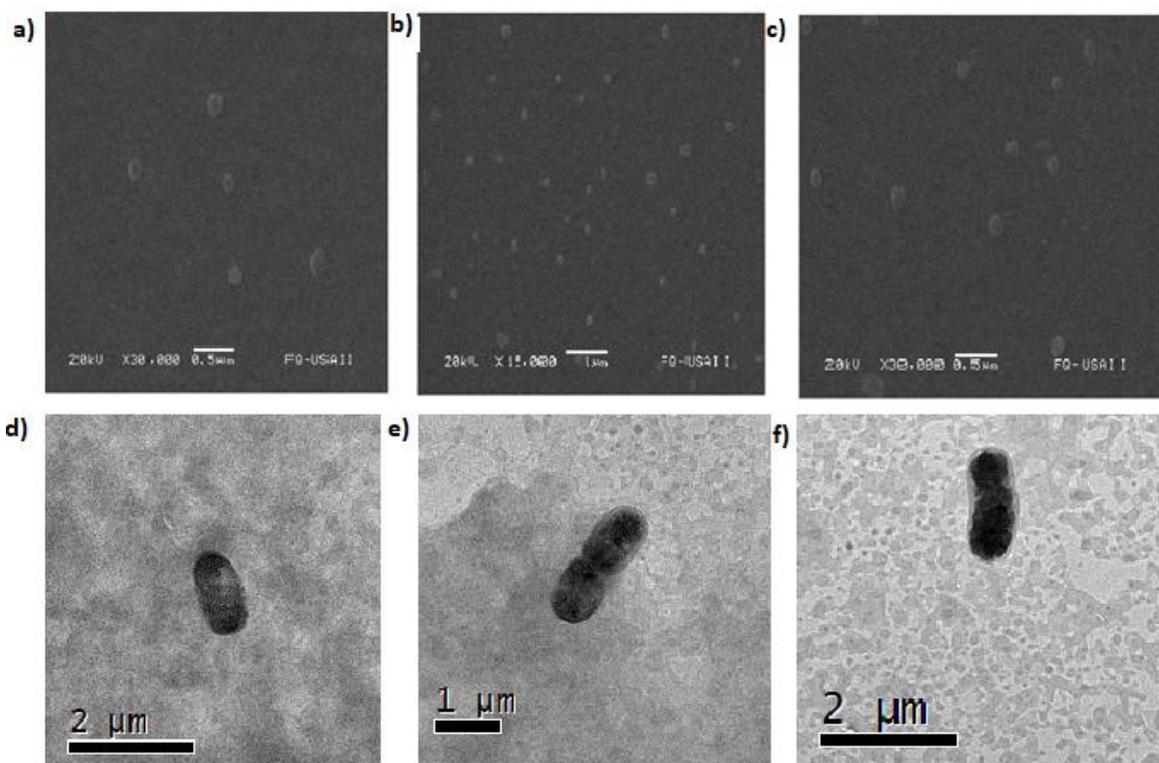


Figura 5.19 Microscopía electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC: PINO

5.4 Sistema liposomal DPPC:PINO:CHOL.

5.4.1 Calorimetría diferencial de barrido de DPPC: PINO: CHOL.

Para el último sistema estudiado, formado de DPPC: CHOL: PINO se obtuvo que el ΔH° y ΔS° se abatieron (tabla 5.12), lo que indica que el liposoma está más fluido. En la traza calorimétrica sólo apareció un pico (figura 5.20), lo que indica que la incorporación del CHOL al sistema DPPC: PINO ayuda a que haya una distribución uniforme a lo largo de la bicapa lipídica, obteniendo un sistema más estable; esta estabilidad se ve reflejada en el valor del potencial Z de -6.59 ± 0.84 mV. De la figura 5.21 a 5.25 se observa que el sistema permaneció en una sola fase por 20 días. En la figura 5.26 y tabla 5.13 se observa que el liposoma tuvo un tamaño de partícula cercano a los 100 nm.

Tabla 5.12 Resultados de los parámetros termodinámicos de los liposomas de DPPC: PINO:CHOL caracterizados por DSC.

Liposoma	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ / \text{kcal mol}^{-1}$ 1	$\Delta S^\circ / \text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$
DPPC:PINO:CHOL	36.39 ± 0.28	1.30 ± 0.66	4.20 ± 0.02	15.69 ± 2.74

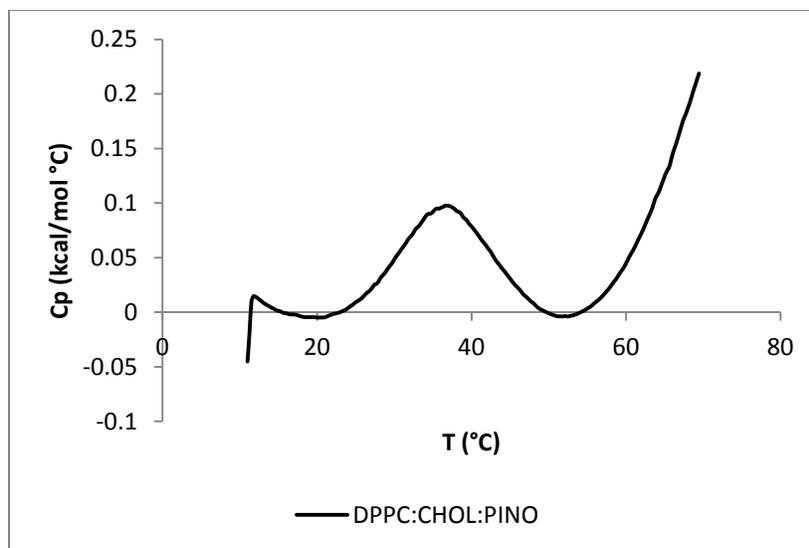


Figura 5.20 Termograma DSC del sistema DPPC: CHOL: PINO

5.4.2 Dispersión dinámica de la luz de DPPC: PINO: CHOL. Tamaño de partícula y Potencial Z.

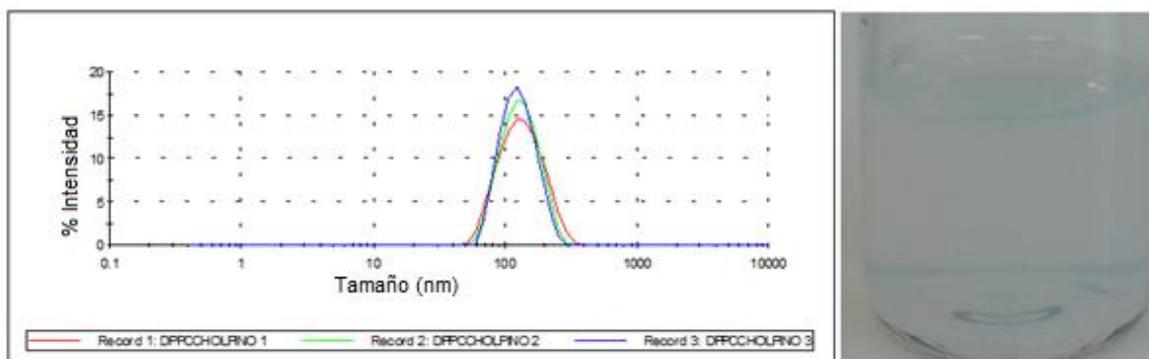


Figura 5.21 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: PINO (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 1.

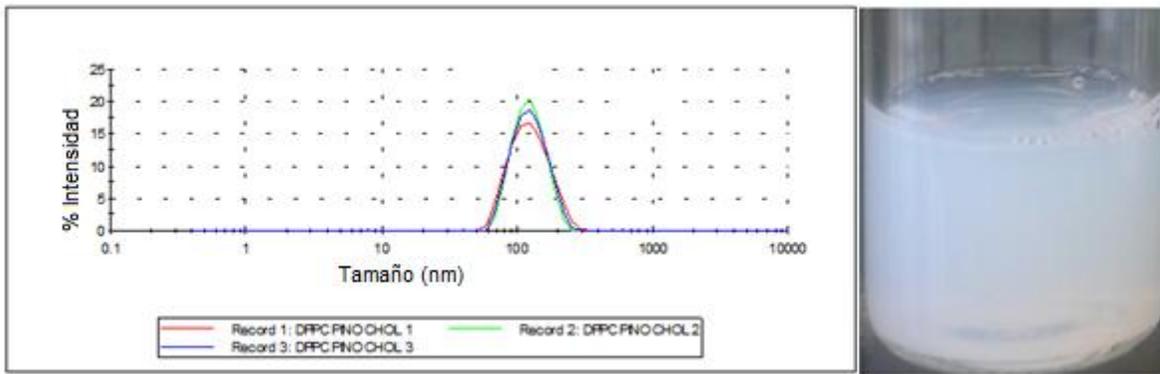


Figura 5.22 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 5.

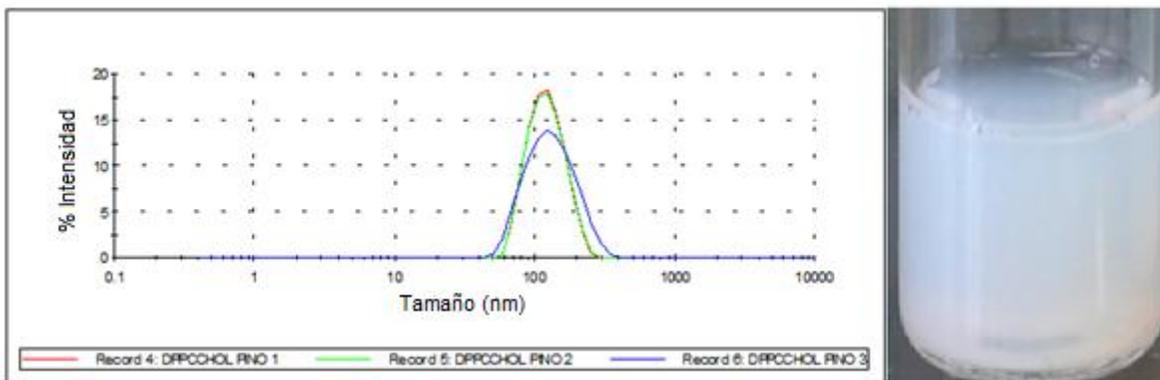


Figura 5.23 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 10.

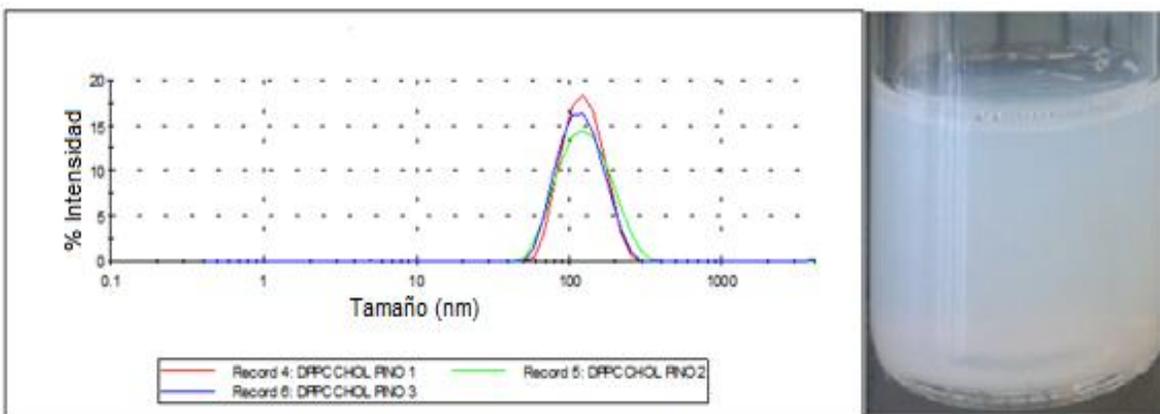


Figura 5.24 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 15.

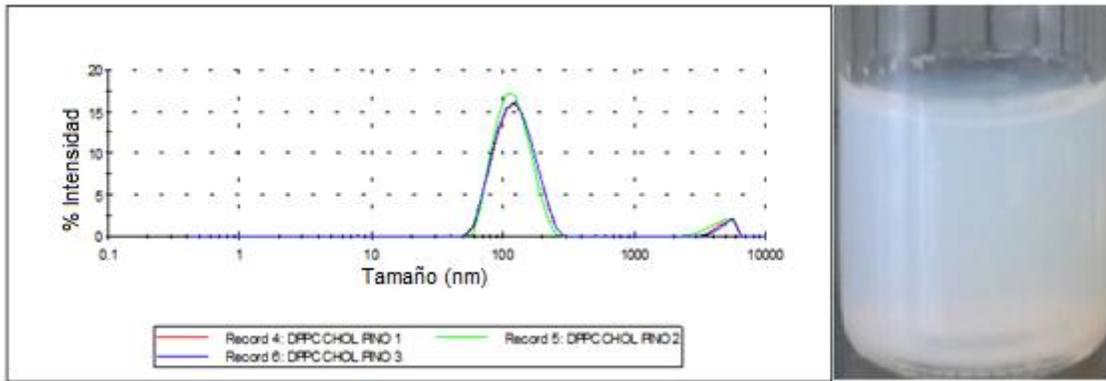


Figura 5.25 Gráfica de distribución gaussiana del sistema liposomal de DPPC: CHOL: PINO (izquierda), apariencia de suspensión liposomal (derecha) al día 20.

Tabla 5.13 Resultados de tamaño y PDI del sistema liposomal DPPC:PINO:CHOL.

Día	Sistema DPPC:CHOL:PINO Tamaño de partícula / nm	PDI
1	122.80 ± 0.15	0.11 ± 0.03
5	117.00 ± 0.70	0.08 ± 0.02
10	120.30 ± 1.11	0.15 ± 0.03
15	117.60 ± 0.23	0.12 ± 0.05
20	128.20 ± 1.79	0.25 ± 0.00

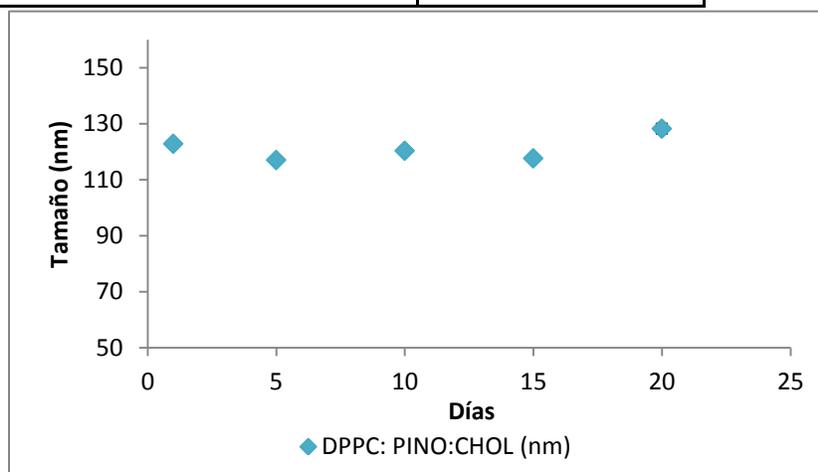


Figura 5.26 Gráfica de tamaño de partícula del sistema liposomal DPPC: PINO: CHOL.

5.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) del sistema DPPC:PINO:CHOL.

En la figura 5.27 se observa la SEM (a, b y c) de los liposomas formados de DPPC: PINO: CHOL. Éstos tienen una forma esferoide y son de un tamaño aproximado de 100 nm con polidispersividad pequeña, no se observaron conglomerados por lo que la muestra es estable. En la TEM (d, e y f) se observan puntos negros asociados a los liposomas unilamelares y de tamaño de 100 nm como en la SEM.

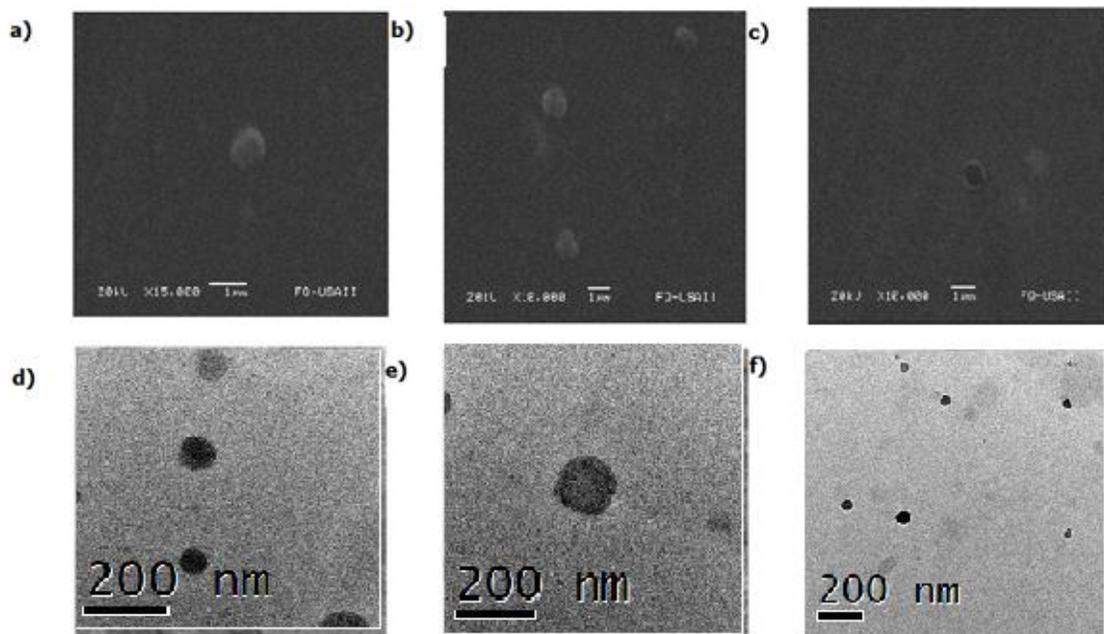


Figura 5.27 Microscopía electrónica de barrido (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión (d, e y f) del sistema de DPPC: PINO: CHOL.

5.5 Determinación de la concentración de saturación de la bicapa lipídica con la incorporación de pinocembrina.

Basándose en los antecedentes discutidos en la sección 3.1.1, se pretende adjudicar un tipo de perfil al comportamiento termotrópico que ocurre al incorporar PINO al sistema liposomal de DPPC, para así determinar en qué parte de la bicapa lipídica se incorpora.

En la tabla 5.14 se observan los resultados obtenidos por la técnica de calorimetría diferencial de barrido, de los liposomas de DPPC, a los cuales se le añadieron diferentes concentraciones de PINO, estos valores se graficaron posteriormente para representar mejor el comportamiento. Se observa que tienen una tendencia y se le puede adjudicar un tipo de perfil de transición. En la figura 5.28 se observan los termogramas obtenidos. Se puede ver claramente cómo la incorporación de PINO a la membrana hace que la forma de la traza calorimétrica cambie considerablemente, al aumentar la concentración de aditivo. El pico se ensancha y la temperatura principal se recorre a temperaturas más bajas, por lo que en esta zona antes de la saturación se le adjudica un perfil de transición tipo A↓.

Una vez que hay una concentración alta de PINO, se forman dos máximos, indicando que la membrana está saturada. Estos máximos representan una fase modificada por la PINO que coexiste con la fase no modificada, viendo que cada fase tiene características de empaquetamiento claramente diferentes, se adjudica una perturbación de tipo D↓, indicando que la PINO está localizada en la región del esqueleto de glicerol. Como se comentó anteriormente los perfiles tipo B↓ son una combinación de perfiles tipo A↓ y D↑, los cuales concuerdan con los datos experimentales, demostrando que la localización de la PINO en la membrana lipídica, depende de la concentración del aditivo.

Tabla 5.14 Resultados termodinámicos de los sistemas liposomales con diferentes concentraciones de pinocembrina caracterizados por DSC.

[PINO] / mM	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ_{\text{total}}/\text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ / \text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$
0	40.72 ± 0.43	5.25 ± 0.0679	16.72 ± 0.22	1.01 ± 0.00
0.4028	40.34 ± 0.06	7.82 ± 0.20	24.95 ± 0.64	1.92 ± 0.88
0.5584	39.96 ± 0.13	6.88 ± 0.35	21.97 ± 1.12	2.25 ± 0.25
0.8766	38.95 ± 0.06	6.17 ± 0.35	19.76 ± 1.11	2.34 ± 0.14
1.296	38.10 ± 0.06	8.20 ± 1.17	26.35 ± 3.74	4.33 ± 0.15
1.811	35.89 ± 0.03	7.27 ± 0.09	23.52 ± 0.31	7.06 ± 0.15
2.373	33.16 ± 0.10	5.30 ± 0.61	17.30 ± 2.01	9.52 ± 0.25
2.89	35.48 ± 0.11	5.48 ± 0.28	17.76 ± 0.92	10.69 ± 0.14

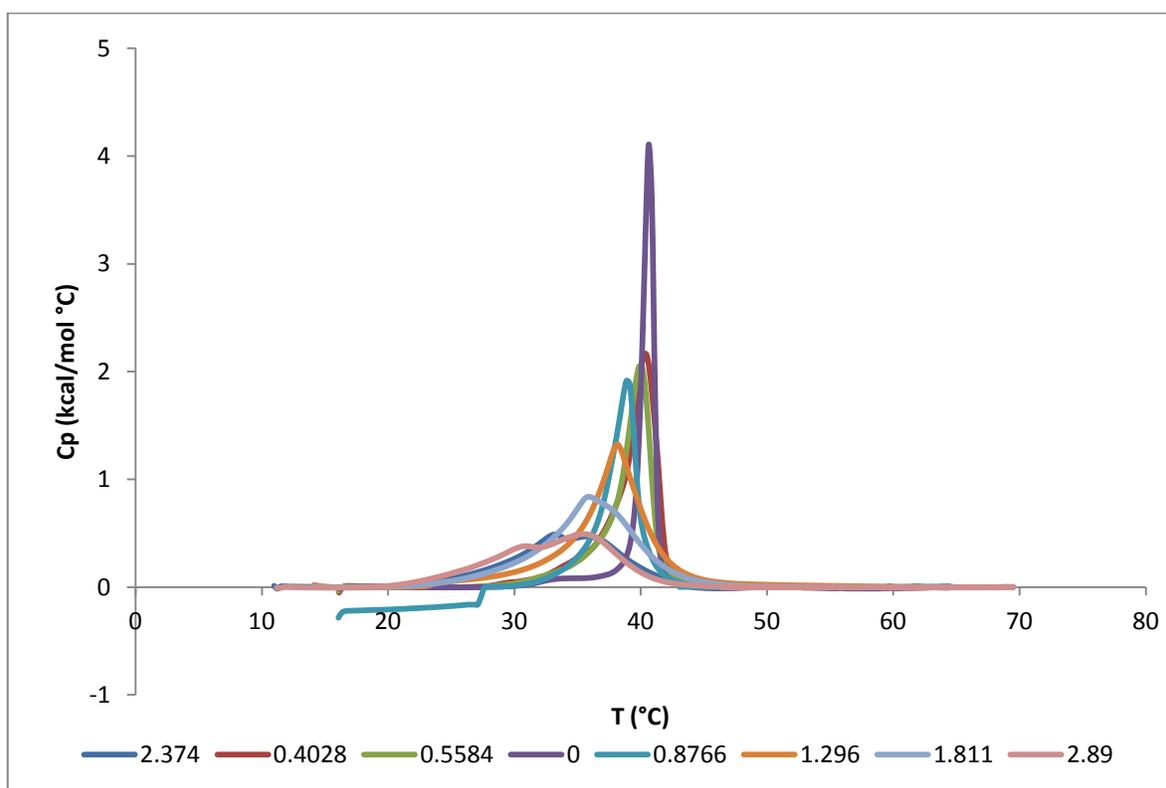


Figura 5.28 Termograma de los sistemas liposomales con diferentes concentraciones de pinocembrina caracterizados por DSC.

En la figura 5.29 se puede ver claramente que la temperatura de transición principal (T_m) se recorre a temperaturas más bajas al agregar PINO, para el cambio de fase, demostrando que las cadenas se encuentran más fluidas. A bajas concentraciones se demuestra que la PINO tiene un comportamiento tipo A↓, colocándose en la sección del C₁-C₉, pero una vez que ocurre la saturación de la membrana, ya no se puede definir una sola T_m , y al aumentar la concentración la separación entre ambos picos es mayor, definiéndolos claramente, mostrando un perfil tipo D↑, indicando que en este punto las moléculas de pinocembrina se van acomodando en la parte cercana a la cabeza del glicerol. Por esta razón, el programa Origin8.5® toma un promedio de los máximos y se reporta una T_m más alta, indicando que el empaquetamiento se hace más fuerte, entonces el cambio de fase de todo el sistema se da a temperaturas más altas. Se puede ver que hay una dependencia de la concentración; al agregar más pinocembrina, ésta se sigue incorporando a la bicapa lipídica ocasionando que se ensanche el pico a la media altura ($T_{1/2}$), por lo que este valor tiende a aumentar. De acuerdo a las observaciones anteriores se puede decir que el comportamiento termotrópico coincide con el perfil tipo B↓ (Combinación de los perfiles A↓ y D↑).

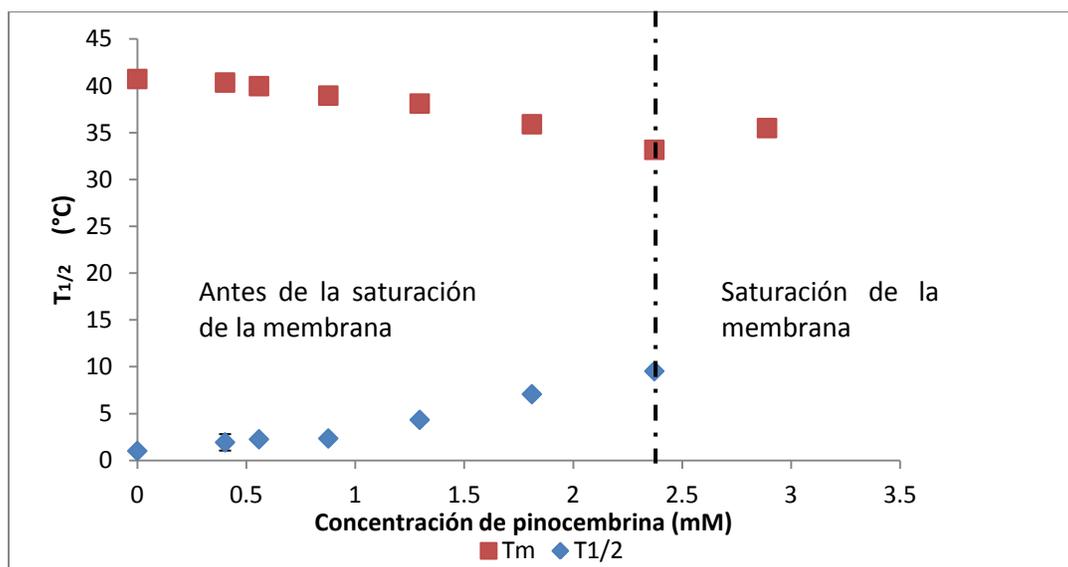


Figura 5.29 Variación del T_m de transición y $T_{1/2}$, conforme aumenta la concentración de pinocembrina en el sistema liposomal de DPPC (~10mM).

En la figura 5.30 se observa que el ΔH° en este tipo de perfil no se ve ampliamente modificado, al aumentar la concentración PINO, a pesar del abatimiento de T_m y el aumento de $T_{1/2}$. El área bajo el pico aumenta un poco al aumentar la concentración, ocurre esto antes de la saturación. Después de la saturación el ΔH_{total} es muy parecido; lo que quiere decir que se requiere una energía similar para el cambio de fase, lo cual es consistente con el perfil tipo B↓; ya que al estar en la región del esqueleto del glicerol, las cadenas se ven poco afectadas.

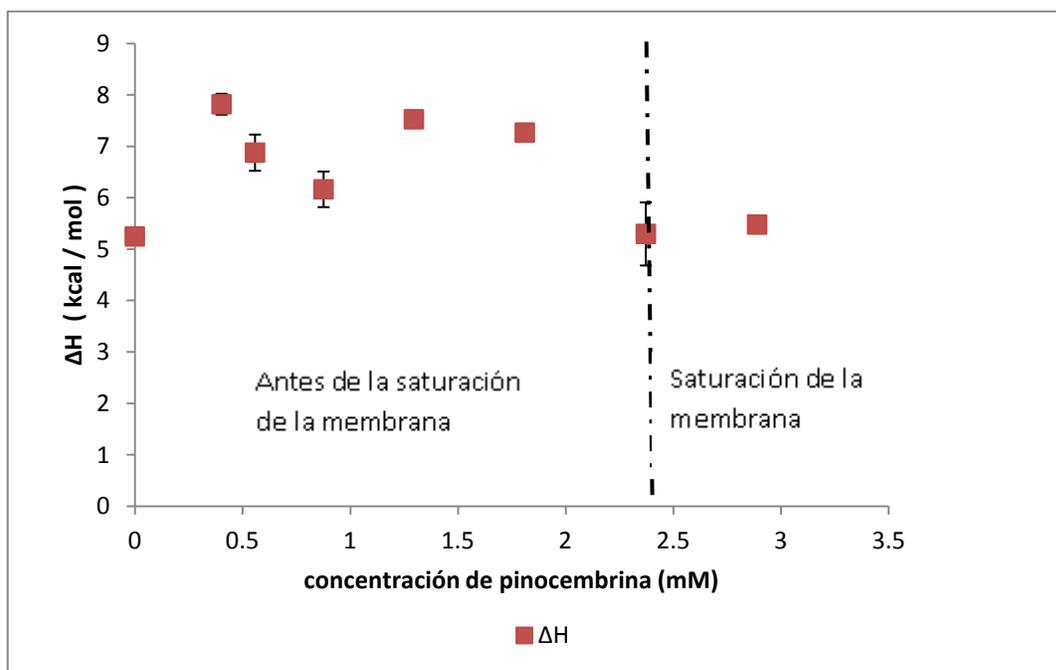


Figura 5.30 Variación del ΔH° de transición, conforme aumenta la concentración de pinocembrina en el sistema liposomal de DPPC (~ 10 mM).

En la figura 5.31 se puede observar cómo varía el tamaño de partícula de los liposomas formados al aumentar la concentración de PINO. El tamaño de partícula, antes de la saturación de la membrana, tiende a disminuir conforme aumenta la concentración, esto se puede deber a que al estar colocada la PINO cerca del C_1 - C_9 , como se muestra en calorimetría, las cadenas hidrocarbonadas no se ven afectadas, por lo tanto se pueden acomodar mejor y el tamaño de partícula disminuye. Después de la saturación de la membrana el tamaño de partícula tiende a retomar el mismo tamaño que se tenía antes de la incorporación

de PINO, esto se puede atribuir a que al saturar la membrana, ésta crece debido a que en el dominio de PINO va aumentando (reforzándose) y hace que haya un ensanchamiento de la membrana, como se demostró en el aumento de $T_{1/2}$ y en el valor de ΔH° del cada dominio, vista por la técnica de DSC.

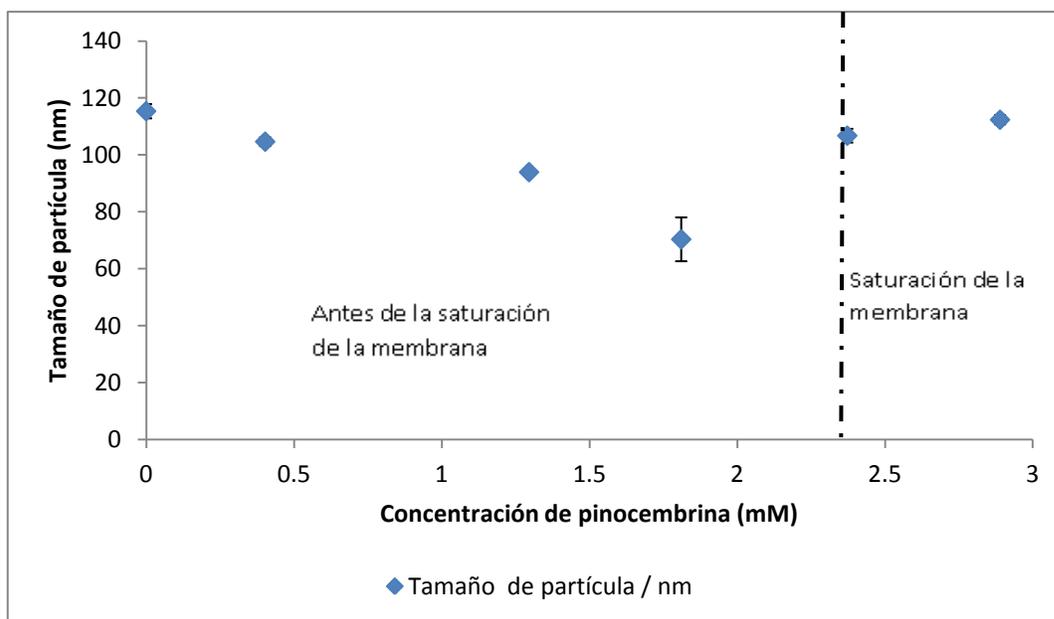


Figura 5.31 Variación del tamaño de partícula, conforme aumenta la concentración de pinocembrina en el sistema liposomal de DPPC (~10mM).

5.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación de pinocembrina en liposomas de DPPC por espectrofotometría de UV-Visible.

5.6.1 Curva patrón de pinocembrina en etanol.

En la figura 5.32 se pueden ver las absorbancias para obtener la curva patrón de pinocembrina, que de acuerdo a la ley de Lambert-Beer, la señal obtenida es proporcional a la concentración de PINO que se encuentra en disolución. Se hizo una corrección por volumen debido a las diluciones que se realizaron. En la tabla 5.15 se reportan las concentraciones de PINO y las absorbancias, las cuales se graficaron en la figura 5.33 obteniendo una $R^2=0.9939$ por lo que tiene un comportamiento lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, la cual más adelante se

utilizó para determinar la concentración de PINO en diferentes sistemas liposomales. Las concentraciones de las muestras que se estudiaron debieron de entrar en el rango de absorbancias de la curva patrón para poder realizar una extrapolación a cero.

La ecuación de la recta que se obtuvo fue:

$$y = 53.677x + 0.135$$

Donde y es la absorbancia y x es la concentración de PINO en la muestra de estudio.

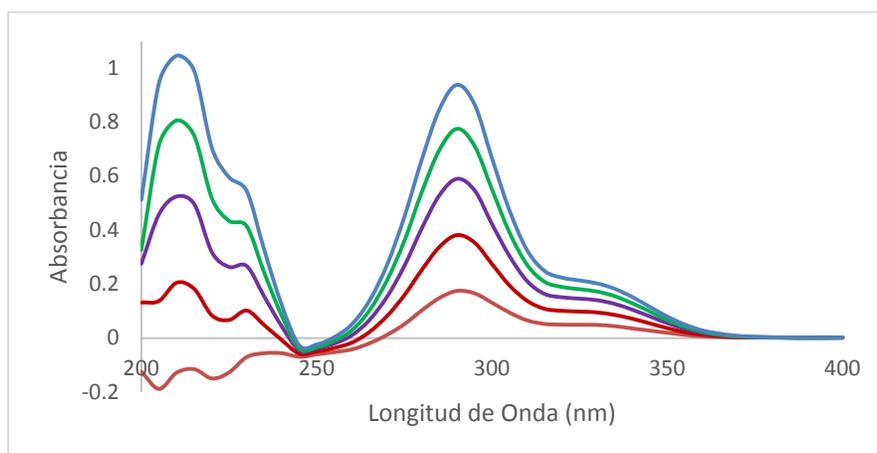


Figura 5.32 Absorbancias obtenidas de diferentes concentraciones de PINO en etanol.

Tabla 5.15 Concentraciones y absorbancias de PINO para la formación de la curva patrón de pinocembrina en etanol.

Concentración de PINO (mg/mL)	Absorbancia
0.000295	0.17 ± 0.01
0.0059	0.42 ± 0.04
0.00885	0.59 ± 0.01
0.0118	0.78 ± 0.02
0.01475	0.94 ± 0.07

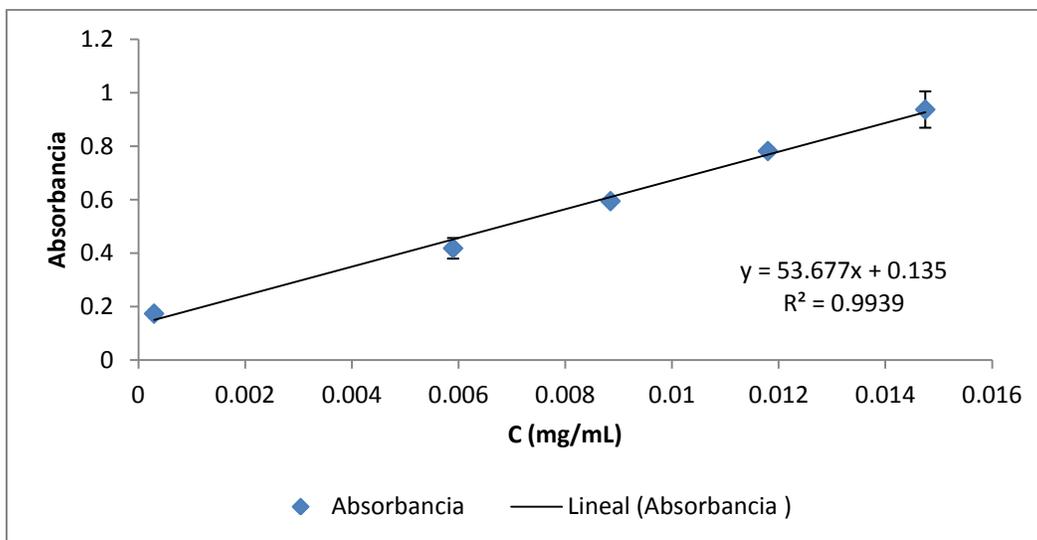


Figura 5.33 Curva patrón de pinocembrina en etanol.

5.6.2 Método de centrifugación para determinar %EE.

Debido a que no se conocían las condiciones para determinar la PINO que se logró encapsular en el liposoma de DPPC, se tomaron 2 fracciones de 1 mL del sistema liposomal. Se sabe la cantidad de PINO que se agregó al formar los liposomas de DPPC, la cual fue 3.04 mg. Posteriormente las 2 fracciones se centrifugaron por dos horas a 15000 rpm y 25°C, después de este tiempo se observó la precipitación de los liposomas, luego se tomó una alícuota del sobrenadante de 50 µL, se le agregaron 950 µL de etanol y se agitó mecánicamente para homogenizar la disolución, posteriormente se midió por UV-Visible en un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm, la señal que corresponde a la PINO se encuentra cercana a 290 nm, como la muestra aún estaba turbia se centrifugó por dos horas y media más y se volvieron a tomar 50 µL, se diluyeron en 950 µL de etanol para medir UV-Visible. Este procedimiento se repitió una vez más y las absorbancias obtenidas para cada experimento se observan en la figura 5.34. Posteriormente con la ecuación de la curva patrón, se despejó la x que es la concentración de PINO no encapsulada de los dos ensayos realizados.

$$x = \frac{y - 0.135}{53.677}$$

Se hizo una corrección por volumen y así se obtiene el porcentaje que no se encapsuló y haciendo una diferencia se obtiene el porcentaje de encapsulación.

$$\%EE = \frac{[PINO]_{total} - [PINO]_{no\ encapsulada}}{[PINO]_{total}} * 100$$

Los resultados se reportan en la tabla 5.17, en la cual se puede ver que entre periodos más largos de tiempo de centrifugación se van precipitando más los liposomas. En la tabla 5.16 se observa cómo va pasando el sobrenadante de más turbio a menos, esto es más evidente de 2 horas a 4 horas 30 min. Después de transcurridas 7 horas de centrifugación, a simple vista no se ve un cambio pero al hacer la medición de absorbancia, la señal va disminuyendo, y por lo tanto la cantidad de PINO en el sobrenadante. Como no se vio un cambio significativo ni visualmente ni en la medición de absorbancia se dejó de centrifugar.

Utilizando este método, las eficiencias de encapsulación son congruentes con las cantidades añadidas de PINO al sistema. Transcurridas 7 horas se logra precipitar gran cantidad de liposomas sin añadir sustancias ajenas a él como en el método que utiliza protamina.

Este método se ve limitado debido a que después de transcurrido un tiempo los liposomas se vuelven a suspender. Al no estar completamente separados los liposomas del sobrenadante, se pueden cometer errores de medición, pues depende de dónde se tome la alícuota, debido a que la concentración es diferente en la superficie del sobrenadante, en el bulto o en la interfaz. Los periodos de tiempo de centrifugación son muy largos, éstos podrían ser más cortos utilizando una ultracentrífuga.

Tabla 5.16 Imágenes de las fracciones después de 2, 4:30 y 7 horas de centrifugación del sistema liposomal de DPPC: PINO.

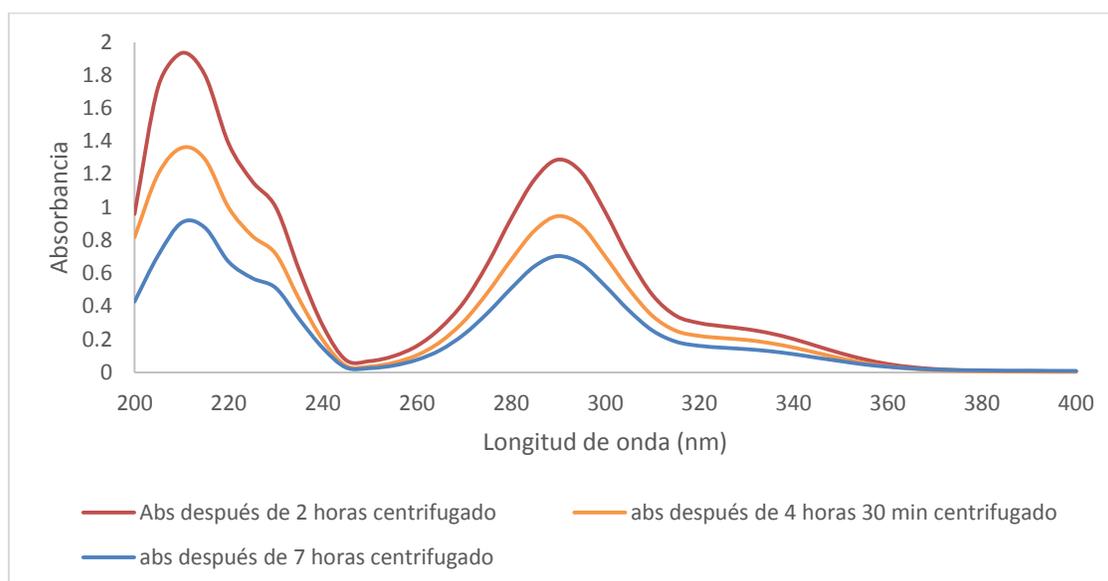
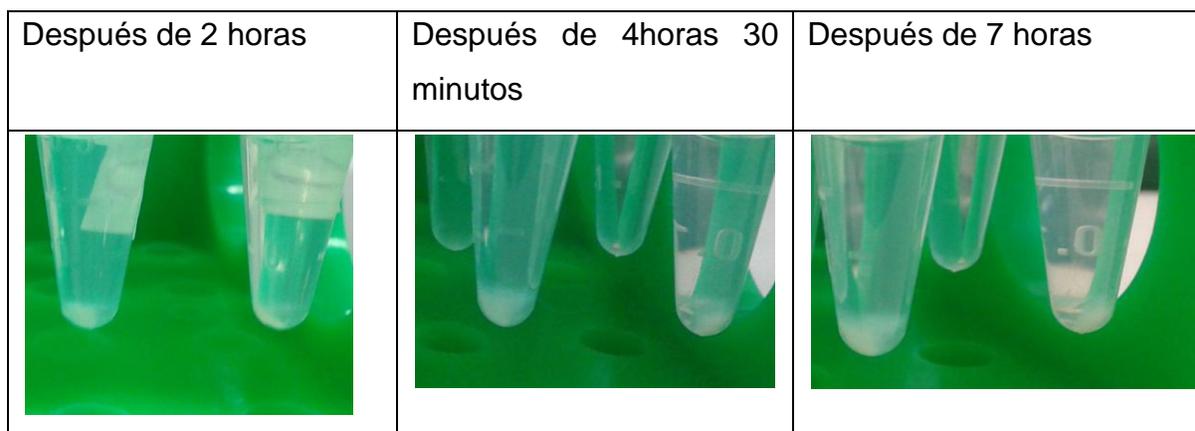


Figura 5.34 Absorbancias obtenidas después de 2, 4:30 y 7 horas de centrifugación de DPPC: PINO.

Tabla 5.17 %EE de los dos ensayos realizados por centrifugación.

Horas	%EE ₁	%EE ₂	%EE promedio
2	29.28	29.04	29.16 ± 0.17
4: 30	50.24	59.68	54.96 ± 6.67
7	65.13	68.87	67.00 ± 2.64

Una vez que ya se habían determinado las condiciones de precipitación. Se aplicó el mismo método para el liposoma de DPPC: PINO: CHOL y sistemas liposomales de DPPC con diferentes concentraciones de PINO.

Tiempo de centrifugación: 7 horas.

Revoluciones por minutos: 15000 rpm.

Temperatura: 25 °C.

En la Tabla 5.18 se resumen los porcentajes de encapsulación para tres sistemas liposomales con diferentes concentraciones de PINO, donde a mayor concentración, se puede ver que el porcentaje de encapsulación aumenta. Como se demostró con DSC al agregar más concentración de PINO al liposoma, se refuerza el empaquetamiento entre las mismas moléculas, por lo tanto más moléculas se incorporan a la bicapa lipídica. Se logró encapsular mayor cantidad de PINO al agregar CHOL, debido a que aumenta la hidrofobicidad del liposoma, favoreciendo la capacidad de encapsulación. [37, 38]

Tabla 5.18 %EE de PINO en sistemas liposomales por el método de centrifugación.

Sistema liposomal	Concentración PINO (mg mL ⁻¹)	%EE ₁	%EE ₂	%EE promedio
DPPC: PINO: CHOL.	0.624	91.82	92.54	92.18 ± 0.51
DPPC: PINO 1	0.222	84.61	85.87	85.25 ± 0.89
DPPC: PINO 2	0.141	50.16	49.83	49.99 ± 0.23
DPPC: PINO 3	0.102	35.89	36.80	36.35 ± 0.65

5.6.3 Método de precipitación de liposomas con un agente coagulante (protamina) para determinar %EE.

Para determinar la cantidad de protamina que se necesitaba para hacer precipitar los liposomas se hicieron conglomerados de liposomas al agregar 20 µL de un agente coagulante (protamina), posteriormente para sedimentar estos

conglomerados se centrifugaron por 6 min a 15000 rpm y 25 °C. En la figura 5.35 se puede apreciar la precipitación de los liposomas.

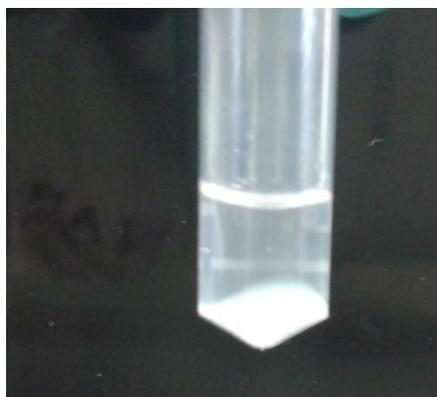


Figura 5.35 Precipitación de liposomas con protamina.

Después se tomó una alícuota del sobrenadante de 50 μ L y se diluyeron en 950 μ L de etanol y se midió la absorbancia. Una vez que el equipo lanzó la absorbancia a una longitud de onda de 290 nm (figura 5.36), se agregaron otros 20 μ L de protamina para precipitar más liposomas y se tomó una alícuota como se mencionó anteriormente. Se obtuvo el espectro de absorbancia (figura 5.36) y se puede ver que el valor de la absorbancia a 290 nm disminuye, demostrando que a más cantidad de protamina, precipitan más liposomas. Sin embargo se puede ver que aparece una segunda señal a 330 nm. Esperando que la adición de más protamina precipitara más liposomas se agregaron 50 μ L de protamina y se siguió con la misma metodología, pero esta vez en lugar de disminuir la absorbancia a 290 nm, señal atribuida a la PINO, esta señal se ensanchó, teniendo un rango mayor de longitud de onda dificultando la selección de un máximo asociado a este punto. La señal a 330 nm creció (figura 5.36). Por lo tanto hay una cantidad límite de protamina a la cual no se pueden precipitar más liposomas, porque ocurre una interacción en el sistema [38, 39]; cambiando de color la disolución y como consecuencia el desplazamiento de la absorbancia, por lo tanto la cuantificación de PINO ya no es posible.

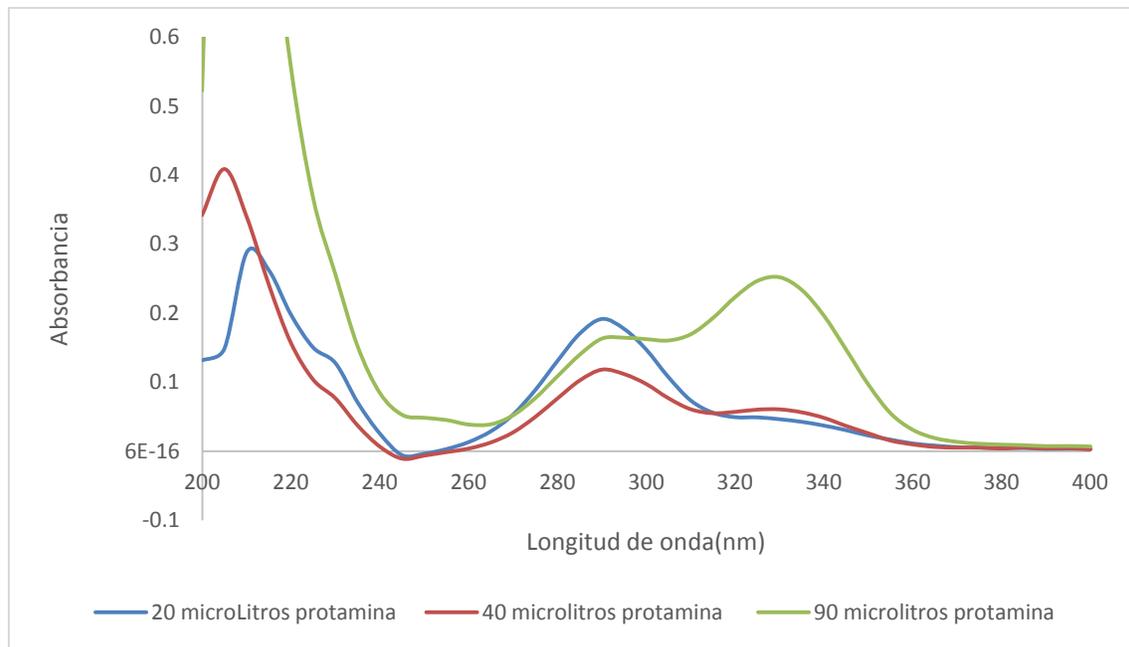


Figura 5.36 Absorbancias obtenidas al agregar diferentes volúmenes de protamina al sistema liposomal de DPPC: PINO.

Tomando en cuenta las determinaciones anteriores, se decidió fijar la metodología de la siguiente manera: agregar 20 μL de protamina al sistema de estudio, y tomar alícuotas de 50 μL para diluirlas en etanol, ya que al agregar esta cantidad sólo aparece un pico claro en 290 nm. Las condiciones para la determinación de % EE para diferentes concentraciones de PINO son las mismas.

Tiempo de centrifugación: 6 min.

Revoluciones por minutos: 15000 rpm.

Temperatura: 25 °C.

Las absorbancias para cada sistema liposomal se reportan a continuación en la figura 5.37. Para determinar el %EE se realizaron correcciones por volúmenes debido a las disoluciones en etanol, extrapolaciones en la curva patrón de PINO y diferencias debido a que la señal brinda la cantidad de PINO no encapsulada.

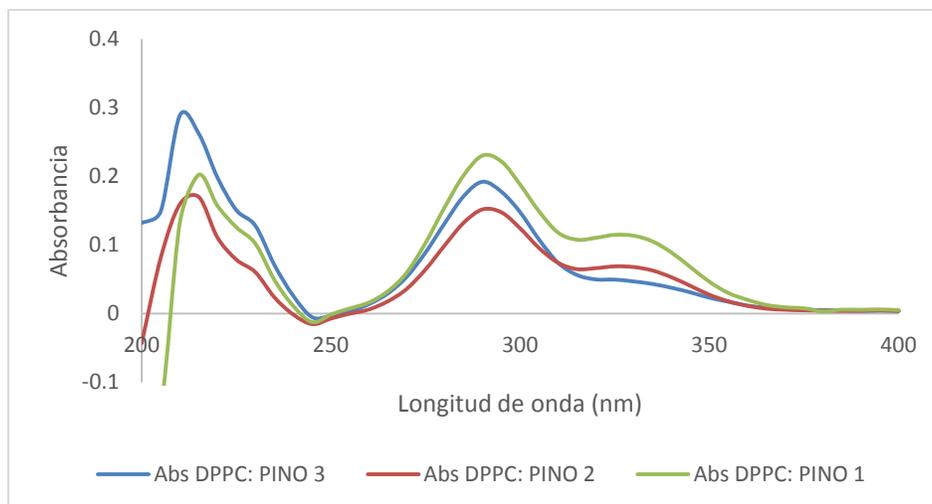


Figura 5.37. Absorbancia de pinocembrina no encapsulada en el sistema liposomal, DPPC: PINO 1, DPPC: PINO 2 y DPPC: PINO 3 por el método de protamina.

En la tabla 5.19 se reporta el %EE para cada sistema y se puede observar que no hay una tendencia en la determinación, debido a que la disolución se torna de un color amarillo, dificultando la cuantificación de una manera significativa y no precipita la mayor cantidad de liposomas, sin contaminar la señal de absorbancia. Las ventajas de este método son que el tiempo de centrifugación es corto y que una vez precipitados los liposomas, éstos no se vuelven a suspender. Sin embargo, las interacciones que ocurren en el sistema al estar en contacto con la protamina, hacen que no sea el mejor método para obtener el % EE.

Tabla 5.19 %EE de PINO en sistemas liposomales precipitados con Protamina.

Sistema liposomal	Concentración PINO (mg mL ⁻¹)	% EE
DPPC: PINO 1	0.222	67.47
DPPC: PINO 2	0.141	90.86
DPPC: PINO 3	0.102	78.76

5.6.4 Método con filtros Amicon® Ultra para determinar %EE.

Los filtros Amicon® Ultra proporcionan una ultrafiltración rápida, con la capacidad de alta concentración y una fácil recuperación del concentrado. En este caso los liposomas son los que concentramos en la membrana y la solución es la que se midió realizando diluciones en etanol como en los casos anteriores. Las condiciones para la determinación de % EE para diferentes concentraciones de PINO son:

Tiempo de centrifugación: 25 min.

Revoluciones por minutos: 15000 rpm.

Temperatura: 25 °C.

En la figura 5.38 se presenta al filtro utilizado, al cual tiene la capacidad de 500 μ L con un tamaño de poro de 10 kDa, Los resultados se muestran a continuación.



Figura 5.38 Filtros Amicon® Ultra

En la tabla 5.20 se resumen los %EE utilizando los filtros Amicon® Ultra, se puede ver que los porcentajes de encapsulación son mayores al 90%, independientemente de la cantidad de PINO que se le agregue al sistema liposomal. En el caso del DPPC: PINO: CHOL 2, se obtuvo un porcentaje de encapsulación del 98.36 %, esta encapsulación fue mejor, confirmando una vez más que la incorporación de CHOL al sistema aumenta la hidrofobicidad de la

bicapa lipídica, permitiendo que más moléculas de PINO sean atrapadas en ésta. Este método de encapsulación es el mejor debido a que no altera la estructura ni composición del liposoma, sin alterar la absorbancia de la muestra (figura 5.39). El tiempo de centrifugación es corto y los liposomas se separan por completo de la fase donde hay PINO sin encapsular, por lo que la medición es confiable.

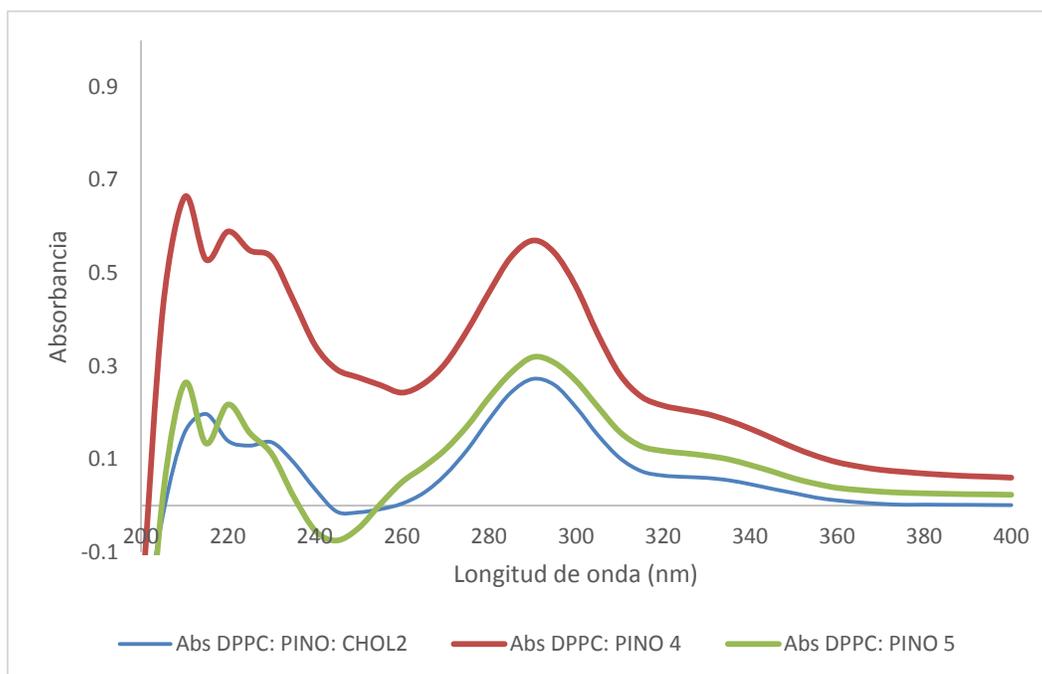


Figura 5.39 Absorbancia de pinocembrina no encapsulada en el sistema liposomal, DPPC: PINO 4, DPPC: PINO 5 y DPPC: PINO: CHOL 2 con filtros Amicon® Ultra.

Tabla 5.20 %EE de PINO en sistemas liposomales con filtros Amicon® Ultra.

Sistema liposomal	Concentración PINO (mg mL ⁻¹)	%EE
DPPC: PINO 4	0.332	95.12
DPPC: PINO 5	0.464	94.83
DPPC: PINO: CHOL 2	0.637	98.36

6 Conclusiones.

Se incorporó pinocembrina en la bicapa lipídica de liposomas de DPPC. La incorporación de PINO en bajas concentraciones hace que las temperaturas de transición de fase se desplacen a temperaturas más bajas y a concentraciones altas ocasiona que se separe el liposoma en dos fases, llamados dominios, un dominio-rico en PINO y otro dominio-pobre en la misma. El sistema liposomal de DPPC: PINO: CHOL es el más estable; ya que tuvo los parámetros termodinámicos más favorables. La estabilidad también se vio reflejada en el valor de potencial Z más lejano de cero de todos los sistemas liposomales formados y estuvo en suspensión estable por 20 días. Los tamaños de partícula de todos los sistemas formados fueron cercanos a 100 nm con dispersiones pequeñas, lo cual se pudo demostrar por DLS, TEM y SEM. Se demostró que los liposomas son esferoides y unilamelares por medio de SEM y TEM. Se determinó la eficiencia de encapsulación, por tres métodos, centrifugación, protamina y utilizando filtros Amicon® Ultra siendo este último el mejor método para determinarlo. Se demostró que la incorporación de CHOL al sistema liposomal de DPPC hace que tenga una mayor capacidad de encapsular PINO.

7 Referencias.

- [1] Santos A, Uyemura S, Lopes J, Bazon J, Mingatto F, and Curti C. (1998). "Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria". *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1455–1461.
- [2] Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). "Flavonoides: Características químicas y aplicaciones". *Cultivos Tropicales*, 22 (2), 5-14.
- [3] Akhtar G, Shafi N, Rahman I U, Ali M Unddin K and Ul Hasan V. (2001). "Naturally Occurring Flavonoids". *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 23, 50-60.
- [4] Havsteen. B. (1983). "Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency". *Biochemical pharmacology*, 32, 1141-1148.
- [5] Rasul A, Millimouno F, Eltayb W, Ali M, Li J and Li X. (2013). "Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities". *BioMed Research International*, 10, 1-9.
- [6] Guo L, Chen X, Li L. N, Tang W, Pan Y. T and Kong J. Q. (2016). "Transcriptome-enabled Discovery and functional characterization of enzymes related to (2S)- pinocembrin biosynthesis from *Ornithogalum caudatum* and their application for metabolic engineering". *Microbial Cell Factories*, 15, 27, 1-19.
- [7] Lan X, Wang W, Li Q and Wang J. (2016). "The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications". *Molecular Neurobiology*, 53, 1794-1801.
- [8] Meng F, Wang Y, Liu R, Gao M and Du G. (2014). "Pinocembrin alleviates memory impairment in transient global cerebral ischemic rats". *Experimental and therapeutic medicine*, 8, 1285-1290.
- [9] Soromou L, Jiang L, Wei M, Chen N, Huo M, Chu X, Zhong W, Wu Q, Balde A, Deng X, and Feng H. (2014). "Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion". *Journal of Immunotoxicology*, 11, 56-61.

- [10] Correia R, Viseu M, Prazeres T and Martinho J. (2012). "Spontaneous vesicles, disks, threadlike and spherical micelles found in the solubilization of DMPC liposomes by the detergent DTAC". *Journal of Colloid and Interface Science*, 379, 56–63.
- [11] Lygre H, Moe G and Holmsen H. (2003). "Interaction of ibuprofen with eukaryotic membrane lipids". *Acta Odontologica Scandinavica*, 61, 303-309.
- [12] Martínez Galicia C. (2016). "Caracterización fisicoquímica de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de liposomas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y nonil glucopiranosido (NGP)". Tesis de licenciatura. UNAM.
- [13] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Woo S, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M and Nejati-Koshki K. (2013). "Liposome: classification, preparation, and applications". *Nanoscale Research Letters*, 8, 2-12.
- [14] Villa-García, M., San Martín-Martínez, E., & Pedroza-Islas, R. (2015). "Liposomas como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*". Barcelona, España: OmniaScience. 215-254.
- [15] Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C and Fessi H. (2012). "Preparation, Characterization and applications of liposomes; State of the art". *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1, 147-168.
- [16] Yogita P, Jadhav S. (2014). "Novel methods for liposome preparation". *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8-18.
- [17] Zhu T.F and Szostak J.W. (2009) "Preparation of Large Monodisperse Vesicles". *PLoS ONE* 4, 4, 1-4
- [18] Costas Demetzos. (2008). "Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability". *Journal of Liposome Research*, 18:3, 159-173.
- [19] McMullen T.P.W, Lewis R.N.A.H, McElhaney R.N. (1993). "Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines". *Biochemistry*, 32, 516–522.

- [20] Biltonen R. L and Lichtenberg D. (1993). "The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations". *Chemistry and physics of Lipids*, 64, 129-142.
- [21] Jain M.K, Wu N, Wray L.V. (1975). "Drug induced phase change in bilayer as possible mode of action of lipid soluble drugs". *Nature (London)*, 255, 494.
- [22] Shimshick E.J, McConnell H.M. (1973). "Lateral phase separation in phospholipid membranes". *Biochemistry* 12, 2351.
- [23] Jain M.K, White H. B. (1977). "Long-range order in biomembrane". *Advances in Lipid Research*.15, 1.
- [24] Jain M.K, Wu N. (1977). "Effect of Small Molecules on the Dipalmitoyl Lecithin Liposomal Bilayer: III. Phase Transition in Lipid Bilayer". *The Journal of Membrane Biology*, 34, 157-201.
- [25] Díaz Oscar. (2013). "Técnicas de Light Scattering para la caracterización de nanopartículas y moléculas". *Instrumentación específica de materiales S.A Malvern*.
- [26] Ruano Aldea M. (2013). "Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas". *Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid*. 103-109.
- [27] Zhu Z. (2014). "Theory on Orthokinetic Flocculation of Cohesive Sediment: A Review". *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 2, 13-23.
- [28] Klang V, Valenta C and Matsko N. B. (2013). "Electron microscopy of pharmaceutical systems". *Micron* 44, 45-74.
- [29] Williams D.B, Carter C.B. (2009). "Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science". Springer, New York. Pág 3-22.
- [30] Koning R.I, Koster A.J. (2009). "Cryo-electron tomography in biology and medicine". *Annals of Anatomy*, 191, 427-445.
- [31] Perez-Arantegui J, Mulvey T. (2005). "Electron microscopy". In: Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed. Elsevier, pp. 114-124.
- [32] Skoog D. A, Holler J. H, Nieman T. A. (2001). "Principios de Análisis Instrumental", 5a Edición. McGraw Hill. Madrid, España. Pág. 322-326.

- [33] Martínez J. F, García M. L. (2012). "Promoción de la salud". 1ª Edición. Parinfo, Madrid, España. Pág. 96-101.
- [34] Piacentini E. (2016). "Encapsulation Efficiency". In: Drioli E., Giorno L. (eds) Encyclopedia of Membranes. Springer, Berlin, Heidelberg, Pág 706-707.
- [35] Wei X, Patil Y, Ohana P, Amitay Y, Shmeeda H. Gabizon, Barenholz. (2017). "Characterization of Pegylated Liposomal Mitomycin C Lipid-Based Prodrug (Promitil) by High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry and Cryogenic Transmission Electron Microscopy". Molecular Pharmaceutics, 14, 4339-4345.
- [36] Salinas Urbano O. (2014). "Caracterización fisicoquímica de la conversión de vesículas de l-alfa-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) a micelas mixtas mediante la adición de n-octil-beta-d-glucopiranosido (OGP)" Tesis de licenciatura UNAM.
- [37] Subczynski W. K, Wisniewska A, Yin J. J, Hyde J. S, and Kusumi A. (1994). "Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol". Biochemistry 33 (24), 7670-7681.
- [38] Briuglia M. L, Rotella C, McFarlane A, Lamprou D. A. (2015). "Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release". Drug Delivery and Translational Research, 5, 231-242.
- [39] Yadav A.V, Murthy M.S, Shete A.S and Sfurti Sakhare. (2011). "Stability Aspects of liposomes". Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 45, 4, 402-413.