



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LA
NANOENCAPSULACIÓN DE MOLÉCULAS HIDROFÍLICAS E
HIDROFÓBICAS DE INTERÉS BIOLÓGICO EN LIPOSOMAS DE
DIESTEAROIL FOSFATIDILCOLINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA RENATA ROMERO ARRIETA



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: ALMA MIRIAM NOVELO TORRES**

SECRETARIO: **Profesor: ELIZABETH URÍA CANSECO**

1er. SUPLENTE: **Profesor: CARLOS JUAREZ OSORNIO**

2° SUPLENTE: **Profesor: SERGIO ALBERTO BERNAL CHAVEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 302, BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

M.C. ELIZABETH URÍA CANSECO

SUSTENTANTE (S):

MARIANA RENATA ROMERO ARRIETA

Agradecimientos

El siguiente trabajo fue realizado gracias a:

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

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

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

El préstamo del equipo Nanosizer ZS SEN (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 Facultad de Medicina, Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, al Dr. Ismael Bustos Jaimes por el préstamo del equipo Nanosizer μ V.

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

Contenido

Índice de tablas	8
Índice de gráficas	10
Índice de figuras	11
Índice de ecuaciones	14
Abreviaturas	14
Capítulo 1 Introducción	16
1.1 Definición del proyecto	16
1.2 Objetivos generales.....	17
1.3 Objetivos particulares.....	17
1.4 Hipótesis	18
Capítulo 2 Antecedentes	19
2.1 Generalidades sobre los lípidos	19
2.2 Ensamblaje de lípidos y generalidades de los liposomas	20
2.3 Interacción de liposomas en sistemas biológicos.....	23
Capítulo 3 Materiales	24
3.1 DSPC	24
3.2 Colesterol	25
3.3 Moléculas de interés biológico	25
3.3.1 Pinocembrina.....	27
3.3.2 Resazurina	29
Capítulo 4 Técnicas.....	30
4.1 Método de obtención de liposomas.....	30
4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	31
4.2.1 Aplicaciones de DSC	34

4.3	Dispersión dinámica de luz (DLS)	38
4.3.1	Tamaño	38
4.3.2	Potencial Z.....	40
4.4	Ultrafiltración por centrifugación	43
4.5	Espectrofotometría UV-VIS	45
4.5.1	Eficiencia de incorporación	48
4.5.2	Eficiencia de encapsulación.....	49
4.6	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	49
Capítulo 5 Equipos y reactivos		52
Capítulo 6 Metodología		52
6.1	Sistemas liposomales.....	52
6.2	Fabricación de liposomas.....	54
	Preparación de película.....	54
	Extrusión	54
6.3	Determinación de eficiencia de encapsulación e incorporación	54
6.4	Análisis fisicoquímico de liposomas	55
	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	55
6.5	Análisis de estabilidad.....	55
	Tamaño de partícula y potencial Z.....	55
	Microscopía electrónica de barrido	56
6.6	Condiciones de almacenamiento	56
Capítulo 7 Resultados		57
7.1	Curvas patrón para la determinación de eficiencia de incorporación y encapsulación	57
7.1.1	Curva de pinocembrina.....	57

7.1.2	Curva de resazurina	62
7.2	DSPC en diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	64
7.2.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	64
7.2.2	Tamaño y potencial Z	65
7.3	DSPC en cloroformo (CHCl ₃)	66
7.3.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	66
7.3.2	Tamaño y potencial Z	67
7.3.3	Morfología.....	68
7.4	DSPC:colesterol	69
7.4.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	69
7.4.2	Tamaño de partícula.....	71
7.4.3	Morfología.....	72
7.5	DSPC:pinocembrina.....	72
7.5.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	72
7.5.2	Tamaño y potencial Z	75
7.5.3	Morfología.....	78
7.5.4	Eficiencia de incorporación	78
7.6	DSPC:pinocembrina:colesterol	79
7.6.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	79
7.6.2	Tamaño y potencial Z	82
7.6.3	Morfología	84
7.6.4	Eficiencia de incorporación.....	84
7.7	DSPC:resazurina	85
7.7.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	85
7.7.2	Tamaño de partícula.....	86

7.7.3	Morfología.....	88
7.7.4	Porcentaje de encapsulación.....	88
7.8	DSPC:resazurina:pinocembrina	89
7.8.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	90
7.8.2	Tamaño	91
7.8.3	Morfología.....	93
7.8.4	Eficiencia de incorporación y encapsulación.	93
Capítulo 8 Discusión. Comportamiento fisicoquímico de liposomas de DSPC		96
8.1	Comportamiento termotrópico de la bicapa lipídica	96
8.1.1	Transición de fase.....	96
8.1.2	Parámetros termotrópicos.....	105
	Entalpía.....	107
	Entropía.....	112
	Cooperatividad molecular	114
	Temperatura de transición	117
8.2	Estabilidad en disolución de la bicapa de liposomas	119
8.3	Morfología de liposomas de DSPC	123
8.3	Eficiencia de incorporación	125
8.4	pH de sistemas liposomales DSPC.....	126
Capítulo 9 Conclusiones		127
Capítulo 10 Perspectivas		128
Capítulo 11 Bibliografía		129

Índice de tablas

Tabla 2-1. Ejemplos de familias de fosfoacilglicerol	19
Tabla 2-2. Formas moleculares y fases polimórficas dinámicas de los lípidos	21
Tabla 2-3. Clasificación de los liposomas según su tamaño y estructura	22
Tabla 3-1. Blancos moleculares de Pinocembrina en diferentes tipos de cáncer	28
Tabla 4-1. Representación de acomodo molecular de la bicapa lipídica de liposomas en el proceso de transición de fase	37
Tabla 5-1. Equipos empleados	52
Tabla 5-2. Reactivos empleados	52
Tabla 6-1. Sistemas liposomales elaborados	53
Tabla 6-2. Sistemas liposomales con pinocembrina	53
Tabla 7-1. Curva patrón de absorbancia (290 nm) de pinocembrina en etanol con diferentes proporciones de agua	58
Tabla 7-2. Curva patrón pinocembrina/etanol/agua 5%	61
Tabla 7-3. Curva patrón de resazurina	62
Tabla 7-4. Curva patrón de resazurina/etanol/agua 5%	63
Tabla 7-5. Parámetros fisicoquímicos obtenidos para DSPC en CH ₂ Cl ₂	65
Tabla 7-6. Tamaño DSPC en diclorometano	65
Tabla 7-7. Potencial Z DSPC en diclorometano	65
Tabla 7-8. Parámetros fisicoquímicos de DSPC en cloroformo	67
Tabla 7-9. Tamaño de partícula de DSPC en cloroformo obtenido por DLS	67
Tabla 7-10. Potencial Z de DSPC en cloroformo	68
Tabla 7-11. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:colesterol	70
Tabla 7-12. Tamaño de liposomas de DSPC:colesterol a través del tiempo	71
Tabla 7-13. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:pinocembrina 4:1	73
Tabla 7-14. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:pinocembrina 4:1 obtenidos por DSC utilizando deconvolución de picos	74
Tabla 7-15. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina 4:1	76
Tabla 7-16. Potencial Z de DSPC:pinocembrina 4:1 Día 1	77
Tabla 7-17. Eficiencia de incorporación de pinocembrina 4:1	79
Tabla 7-18. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:colesterol:pinocembrina 4:1	80

Tabla 7-19. Parámetros fisicoquímicos obtenidos por deconvolución DSPC:pinocembrina:colesterol 4:1	81
Tabla 7-20. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina:colesterol	82
Tabla 7-21. Potencial Z de DSPC:pinocembrina:colesterol.....	83
Tabla 7-22. Cálculo de porcentaje de encapsulación de DSPC:pinocembrina: colesterol usando centrifugación	84
Tabla 7-23. Cálculo de porcentaje de encapsulación de DSPC:pinocembrina:colesterol usando centrifugación inversa	85
Tabla 7-24. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:resazurina.....	86
Tabla 7-25. Tamaño de liposomas de DSPC:resazurina obtenido por DLS.....	87
Tabla 7-26. Cálculo de cantidad de resazurina incorporado al liposoma usando centrifugación inversa.	89
Tabla 7-27. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:pinocembrina resazurina 8:1:1 obtenidos por DSC	91
Tabla 7-28. Tamaño de DSPC:resazurina:pinocembrina obtenido por DLS	91
Tabla 7-29. Cálculo de eficiencia de incorporación de pinocembrina en el sistema DSPC:pinocembrina:resazurina usando centrifugación	94
Tabla 7-30. Cálculo de eficiencia de incorporación de pinocembrina en el sistema DSPC:pinocembrina:resazurina usando centrifugación inversa.....	94
Tabla 7-31. Cálculo de la cantidad de resazurina incorporada al liposoma	95
Tabla 8-1. DSC escaneos de DSPC:pinocembrina (0.50-0.99 mg/mL).....	103
Tabla 8-2. Parámetros fisicoquímicos de los sistemas liposomales.....	106
Tabla 8-3. Parámetros fisicoquímicos obtenidos por DSC de DSPC: pinocembrina a diferentes concentraciones.....	106
Tabla 8-4. Parámetros fisicoquímicos obtenidos por DSC utilizando deconvolución de picos para DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL	107
Tabla 8-5. Morfología de liposomas obtenidas por SEM.....	123
Tabla 8-6. SEM de liposomas con pinocembrina a diferentes concentraciones .	124
Tabla 8-7. Tamaño de liposomas con pinocembrina a diferentes concentraciones	125

Tabla 8-8. Datos y cálculos de eficiencia de incorporación de pinocembrina a diferentes concentraciones.....	125
Tabla 8-9. Valores de pH de liposomas de DSPC.....	126

Índice de gráficas

Gráfica 4-1. Relación entre energía transmitida y concentración o distancia	46
Gráfica 7-1. Curva patrón de pinocembrina en etanol (derecha) y espectro (izquierda)	57
Gráfica 7-2. Curva patrón pinocembrina/etanol/agua 5%	61
Gráfica 7-3. Curva patrón de resazurina/etanol y espectro de absorción.....	62
Gráfica 7-4. Curva patrón de resazurina/etanol/agua 5%	63
Gráfica 7-5. DSC escaneos sobrelapados de DSPC 10 mM en diclorometano	64
Gráfica 7-6 DSC escaneos sobrelapados de DSPC 10 mM en cloroformo.....	66
Gráfica 7-7. Tamaño de DSPC en cloroformo en función del tiempo	67
Gráfica 7-8. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:colesterol 4:1 y 2:1	70
Gráfica 7-9. Tamaño de DSPC:colesterol en función del tiempo	71
Gráfica 7-10. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:pinocembrina 4:1	73
Gráfica 7-11. Deconvolución de picos DSPC:pinocembrina 4:1.....	74
Gráfica 7-12. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina 4:1.....	77
Gráfica 7-13. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:colesterol:pinocembrina... 80	
Gráfica 7-14. Deconvolución de picos de DSPC:pinocembrina:colesterol 4:1	81
Gráfica 7-15. DSPC:pinocembrina:colesterol en función del tiempo	83
Gráfica 7-16. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:resazurina 4:1	86
Gráfica 7-17. Tamaño de liposomas de DSPC: resazurina en función del tiempo	87
Gráfica 7-18. Escaneos sobrelapados de DSPC:resazurina:pinocembrina obtenidos por DSC	90
Gráfica 7-19. Tamaño de DSPC:resazurina:pinocembrina a través del tiempo	91
Gráfica 8-1. Termograma de sistemas liposomales	96
Gráfica 8-2. DSC de sistemas con pinocembrina de 0.16-0.36 mg/mL.....	101
Gráfica 8-3. DSC de sistemas con pinocembrina de 0.50-0.99 mg/mL.....	102
Gráfica 8-4. Entalpía de sistemas liposomales.....	107

Gráfica 8-5. Entalpía de DSPC:pinocembrina a diferentes concentraciones	110
Gráfica 8-6. Entalpía de cada pico obtenida por deconvolución en los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL	110
Gráfica 8-7. Valores de entropía de sistemas liposomales	112
Gráfica 8-8. Entropía de DSPC: pinocembrina a diferentes concentraciones	113
Gráfica 8-9. Entropía de cada pico obtenido por deconvolución en los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL	114
Gráfica 8-10. Valores de $T_{1/2}$ de los sistemas en orden descendente	115
Gráfica 8-11. Valores de $T_{1/2}$ de DSPC:pinocembrina a diferentes concentraciones	116
Gráfica 8-12. Valores de $T_{1/2}$ de los picos obtenidos por deconvolución en los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL	117
Gráfica 8-13. Valores de T_m de los sistemas liposomales	118
Gráfica 8-14. Temperatura de transición de DSPC:pinocembrina a diferentes concentraciones	118
Gráfica 8-15. Temperatura de transición de cada pico obtenido por deconvolución de los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL	119
Gráfica 8-16. Valores de potencial Z de sistemas de DSPC	120
Gráfica 8-17. Tamaño de partícula de liposomas de DSPC	121
Gráfica 8-18. Eficiencia de incorporación de pinocembrina a diferentes concentraciones	126

Índice de figuras

Figura 2-1. Estructura básica de las fosfatidilcolinas. Los tres grupos funcionales principales son dos largas cadenas de acilo que pueden variar en longitud, el componente de glicerol y el grupo de cabeza de fosfato con el grupo colina.	20
Figura 2-2. Representación de liposoma como portador de fármacos	22
Figura 2-3. Posibles vías en los cuáles los liposomas pueden interactuar con la célula	23
Figura 3-1. Molécula de DSPC	24
Figura 3-2. Molécula de colesterol	25

Figura 3-3. Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales ..	26
Figura 3-4. Estructura de pinocembrina y fuentes naturales de obtención.....	27
Figura 3-5. Estructura química y reducción de resazurina a resorufina.	29
Figura 4-1. Representación molecular de obtención de liposomas con método de hidratación de película.	31
Figura 4-2. Tipos de DSC: Compensación de potencia y flujo de calor	33
Figura 4-3. Calorímetro MicroCal VP-DSC.....	34
Figura 4-4. Perfil de transición de fase de liposoma de DSPC.....	36
Figura 4-5. Fenómeno físico de la dispersión de la luz	38
Figura 4-6. Patrón de manchas obtenidas por dispersión de luz.....	38
Figura 4-7. Fluctuaciones de luz dispersada incidiendo en el detector	39
Figura 4-8. Correlación de intensidad de luz dispersa y distribución de tamaño en Zetasizer μ V	39
Figura 4-9. Potencial Z	41
Figura 4-10. Representación de electroforesis Doppler y movimiento de iones hacia los electrodos cuando se aplica un campo eléctrico.....	42
Figura 4-11. Diferencia de frecuencia según la velocidad de la partícula.	43
Figura 4-12. Procedimiento de ultrafiltración	44
Figura 4-13. Recuperación de especie retenida por centrifugación inversa	45
Figura 4-14. Foto y esquema de espectrofotómetro.....	47
Figura 4-15. Representación de monocromador Czerny-Turner.....	48
Figura 4-16. Microscopio electrónico de barrido.....	51
Figura 7-1 Gráficas de curvas patrón con proporción 5-25% de agua y espectro correspondiente.....	58
Figura 7-2 Barrido de adsorción en función de longitud de onda con diferentes porcentajes de agua y determinada concentración de pinocembrina.....	60
Figura 7-3. Precipitado de liposomas al día siguiente de su elaboración	65
Figura 7-4. Potencial Z de DSPC en cloroformo	68
Figura 7-5. Imagen de liposomas de DSPC en cloroformo obtenida por SEM.....	69
Figura 7-6. SEM de DSPC:colesterol	72
Figura 7-7. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina 4:1 al día 1	76

Figura 7-8. Potencial Z de DSPC:pinocembrina 4:1 Día 1	77
Figura 7-9. Imagen obtenida por SEM de DSPC:pinocembrina 4:1	78
Figura 7-10. Potencial Z de DSPC:pinocembrina:colesterol	83
Figura 7-11. Imagen de DSPC:pinocembrina:colesterol obtenida por SEM	84
Figura 7-12. Solución liposomal de DSPC:resazurina.....	87
Figura 7-13. Imagen de DSPC:resazurina obtenida por SEM	88
Figura 7-14. Liposoma de DSPC:resazurina retenido en el filtro Amicon.....	89
Figura 7-15. Formación de partículas doradas dentro de la solución liposomal DSPC:resazurina:pinocembrina	92
Figura 7-16. Cristales de DSPC:pinocembrina:resazurina visualizados por microscopía óptica	92
Figura 7-17. Imagen de DSPC:resazurina:pinocembrina obtenida por SEM	93
Figura 7-18. Espectro de absorción de liposoma DSPC:resazurina:pinocembrina	93
Figura 8-1. Interacciones electrostáticas de grupos polares del fosfolípido con la resazurina durante la pretransición observada en el perfil termográfico.	97
Figura 8-2. Interacción de colesterol con los fosfolípidos del liposoma.....	99
Figura 8-3. Doble pico asimétrico en perfil térmico y representación de la intercalación de pinocembrina en la bicapa lipídica	100
Figura 8-4. Efecto de la incorporación de colesterol en perfil termográfico de DSPC:pinocembrina	104
Figura 8-5. Influencia de resazurina en termograma de DSPC:pinocembrina	105
Figura 8-6. Comportamiento de pinocembrina a diferentes concentraciones dentro del liposoma	111

Índice de ecuaciones

Ecuación 4-1 $\Delta P = \Delta Q dt$	32
Ecuación 4-2 $dq dt = \Delta TRD$	33
Ecuación 4-3 $Cp = \partial q \partial TP$	35
Ecuación 4-4 $\Delta H = T_0 T_1 Cp dT$	35
Ecuación 4-5 $K = BA$	37
Ecuación 4-6 $K = f_1 - f \therefore f = K_1 + K$	37
Ecuación 4-7 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ = -RT \ln K$	37
Ecuación 4-8 $T_m = \Delta H^\circ \Delta S^\circ \therefore \Delta S^\circ = \Delta H^\circ T_m$	37
Ecuación 4-9 $Gt = < n > 2 (1 - Be - \Gamma t)$	40
Ecuación 4-10 $D = RTNA16\pi\mu a$	40
Ecuación 4-11 $ve = \mu e Ee$	42
Ecuación 4-12 $T = PPo$	46
Ecuación 4-13 $-\text{Log } T = a \cdot b \cdot c = A$	46
Ecuación 4-14 $\text{Log } I/I_0 = -\epsilon dc$	47
Ecuación 4-15 $EI = \text{Pinocembrina total} - \text{Pinocembrina no retenida} / \text{Pinocembrina total} \cdot 100$	49
Ecuación 4-16 $ER = \text{Resazurina retenida} / \text{Resazurina total} \cdot 100$	49
Ecuación 7-1 $\text{Abs } 290 \text{ nm} = 0.0686 \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) + 0.0143$	57
Ecuación 7-2 $\text{Abs } 290 \text{ nm} = 0.0966 \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) + 0.0035$	62
Ecuación 7-3 $\text{Abs } 610 \text{ nm} = 0.0982 \times \text{Concentración } \mu\text{g/mL} - 0.0278$	62
Ecuación 7-4 $\text{Abs}(610 \text{ nm}) = 0.0883 \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) + 0.0005$	63

Abreviaturas

ΔH	Entalpía
ΔS	Entropía
CV	Coefficiente de variabilidad
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMPC	Dimiristoil Fosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidilcolina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DSPC	Diestearoil Fosfatidilcolina
EE	Eficiencia de encapsulación
EI	Eficiencia de incorporación
GUVs	Vesículas unilaminares gigantes
LUVs	Vesículas unilaminares grandes
MLVs	Vesículas multilaminares
PDI	Índice de polidispersidad
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SUVs	Vesículas unilaminares pequeñas
T _m	Temperatura de transición principal

Capítulo 1 Introducción

1.1 Definición del proyecto

El cáncer es una enfermedad de alta mortalidad. Actualmente se buscan tratamientos con compuestos extraídos de fuentes naturales que muestren actividades anticancerígenas. Entre éstos se ha identificado un flavonoide presente en la miel, pinocembrina. Se cuenta con una prueba para determinar la actividad citotóxica de los flavonoides contra líneas celulares de cáncer, el ensayo de reducción de resazurina.

Los liposomas son nanoacarreadores comunes para el suministro dirigido de fármacos por las ventajas que poseen como estabilizadores de compuestos terapéuticos, optimizadores de absorción celular y tisular, así como la biodistribución de compuestos en blancos moleculares, permitiendo la liberación efectiva de compuestos encapsulados en éstos y minimizando la toxicidad sistémica. El constituyente principal de la formulación de los sistemas liposomales es el fosfolípido diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) en una concentración de 10 mM.

En el presente estudio, se formularon liposomas conteniendo pinocembrina (molécula hidrofóbica) y encapsulando resazurina (molécula hidrofílica), para ofrecer otra alternativa farmacéutica a las investigaciones efectuadas hasta el momento.

Se elaboraron varios sistemas liposomales: (1) DSPC:disolvente, (2) DSPC:colesterol, (3) DSPC:pinocembrina (8, en diferente concentración), (4) DSPC:colesterol:pinocembrina, (5) DSPC:resazurina y (6) DSPC:resazurina: pinocembrina. Mediante la técnica Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), se analizaron parámetros termodinámicos como entalpía (ΔH), entropía (ΔS), temperatura de transición (T_m) y cooperatividad molecular ($T_{1/2}$). Para los sistemas con pinocembrina y resazurina, se obtuvo la eficacia de incorporación y encapsulación mediante espectrofotometría UV-VIS.

Adicionalmente, se realizaron estudios de dispersión dinámica de luz (DLS), potencial Z y microscopía electrónica de barrido (SEM), para estudiar el tiempo de estabilidad, morfología y lamelaridad de los sistemas liposomales.

1.2 Objetivos generales

- Diseñar un sistema de nanoencapsulación que permita incorporar moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos de los sistemas nanoacarreadores propuestos.
- Definir las características del sistema que favorezcan la estabilidad fisicoquímica.

1.3 Objetivos particulares

- Elaborar liposomas de diestearoilfosfatidilcolina [DSPC], [DSPC:colesterol], [DSPC:pinocembrina], [DSPC:resazurina], [DSPC:colesterol: pinocembrina], [DSPC:pinocembrina:resazurina].
- A partir de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido, obtener los parámetros termodinámicos: entalpía (ΔH), entropía (ΔS), temperatura de transición (T_m) y cooperatividad molecular ($T_{1/2}$), de los sistemas en estudio.
- Determinar la estabilidad de los sistemas liposomales mediante técnicas de dispersión dinámica de luz que permitan obtener tamaño de partícula y potencial Z.
- Interpretar el comportamiento del sistema DSPC con la inclusión de aditivos mediante el estudio de morfología y lamelaridad de liposomas utilizando microscopía electrónica de barrido.
- Obtener la eficiencia de incorporación de pinocembrina y encapsulación resazurina por medio de espectrofotometría UV-VIS.
- Analizar el fenómeno de saturación de la bicapa lipídica, con la inclusión de moléculas hidrofóbicas.

1.4 Hipótesis

- En el sistema liposómico elaborado: las moléculas hidrofílicas (resazurina) se encapsulan dentro del centro acuoso del liposoma, sin interferir con las cadenas de acilo de bicapa lipídica del liposoma.
- Las moléculas hidrofóbicas (pinocembrina y colesterol) se incorporan entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos que forman la bicapa del liposoma.
- La adición de colesterol mejorará la estabilidad del sistema.
- La eficiencia de incorporación de moléculas de pinocembrina dentro de la bicapa de DSPC será alta.

Capítulo 2 Antecedentes

2.1 Generalidades sobre los lípidos

Las membranas biológicas son sistemas que contienen una variedad de componentes moleculares, que incluyen lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Si bien cada uno de estos componentes es vital para la función celular, la base estructural de la membrana está formada por una bicapa de fosfolípidos.

Los fosfolípidos son lípidos que contienen una porción polar y una porción no polar en sus estructuras. Todos los fosfolípidos contienen tres grupos funcionales principales: (i) dos cadenas de acilo largas, generalmente con un número par de átomos de carbono, (ii) el componente de glicerol (fosfoacilgliceroles) o esfingosina (esfingomielinas) y (iii) el grupo de cabeza de fosfato (Gallus, Jürgen; Lin, Qiong; Zumbühl, Andreas; Friess, Sebastian D.; Hartmann, Rudolf; Meister, 2001).

Los fosfolípidos predominantes en la mayoría de las membranas celulares son fosfoacilgliceroles. El grupo fosfato que poseen, puede estar esterificado con un radical hidrofílico. Dependiendo de la naturaleza de dicho radical existen diferentes familias de fosfoacilgliceroles, en la Tabla 2-1 se muestra algunos ejemplos.

Tabla 2-1. Ejemplos de familias de fosfoacilgliceroles

Familia	Radical	Estructura
Fosfatidilcolina (lecitinas)	Colina	$\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
Fosfatidiletanolaminas (cefalinas)	Etanolamina	$\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_3^+$
Fosfatidilserina	Serina	$\text{—O—CH}_2\text{—CH}\begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_3^+ \end{matrix}$

La Figura 2-1 muestra la estructura del tipo de fosfoacilgliceroleos estudiados en este tipo de experimentos, la familia de fosfatidilcolinas. Las fosfatidilcolinas son fosfolípidos de 12 a 18 átomos derivados de ácidos grasos de cadena larga. Ejemplos de fosfatidilcolinas son la Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) de 14 carbonos, Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) de 16 carbonos y Diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) de 18 carbonos.

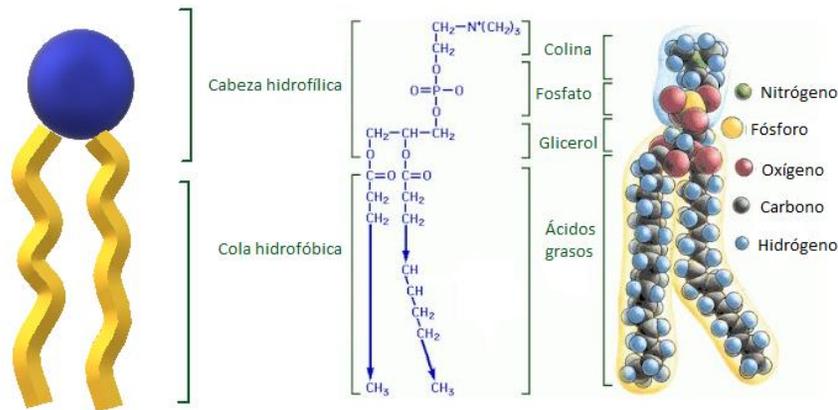
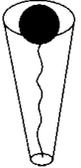
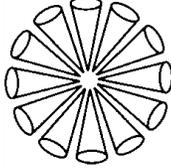
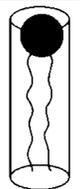
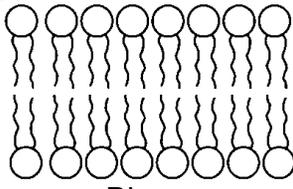
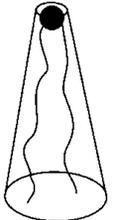
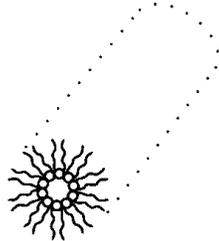


Figura 2-1. Estructura básica de las fosfatidilcolinas. Los tres grupos funcionales principales son dos largas cadenas de acilo que pueden variar en longitud, el componente de glicerol y el grupo de cabeza de fosfato con el grupo colina.

2.2 Ensamblaje de lípidos y generalidades de los liposomas

Los fosfolípidos en solución acuosa pueden formar muchos tipos de ensamblajes, como micelas, liposomas y fases hexagonales, dependientes de las formas moleculares de los fosfolípidos (Tabla 2-2). Adicionalmente, la forma de la estructura también depende de la concentración, temperatura y propiedades fisicoquímicas de la dispersión liposomal. (Abedi Karjiban, Shaari, Gunasakaran, & Basri, 2013).

Tabla 2-2. Formas moleculares y fases polimórficas dinámicas de los lípidos.

Fosfolípido	Forma molecular	Fase polimórfica
Lisofosfolípidos	 Cono invertido	 Micelar
Fosfatidilcolinas	 Cilindro	 Bicapa
Fosfatidiletanolamina (insaturada)	 Cono	 Hexagonal

Los liposomas consisten en vesículas esféricas cerradas, de bicapas lipídicas autoensambladas concéntricas, compuestas de fosfolípidos. Poseen una región liposoluble en el interior de la bicapa o membrana, mientras que las regiones hidrofílicas, se encuentran en el interior y exterior del liposoma.

Los liposomas (Figura 2-2), pueden emplearse como portadores de fármacos gracias al monómero y estructura ensamblada, siendo posible encapsular moléculas de carácter hidrofílico en el interior o centro acuoso del liposoma y moléculas hidrofóbicas entre la doble capa de fosfolípidos. (J. Li et al., 2015). Por lo tanto, el control sobre su estabilidad física se convierte en un requisito importante para el uso eficaz de los liposomas; cualquier cambio en el tamaño de

partícula de los portadores puede afectar a la segmentación, la seguridad y la eficacia.

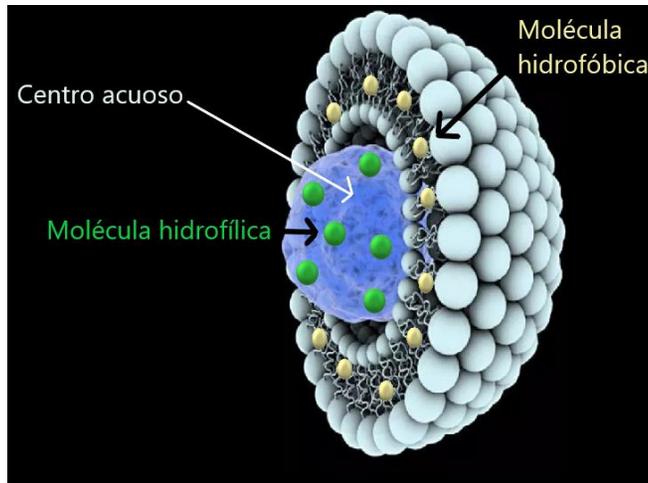


Figura 2-2. Representación de liposoma como portador de fármacos

La Tabla 2-3 muestra la clasificación común de los liposomas, según la estructura de las bicapas lipídicas y el tamaño de las vesículas. (H. Li, Zhao, & Sun, 2018)

Tabla 2-3. Clasificación de los liposomas según su tamaño y estructura

Nombre	Tamaño (nm)	Representación
Vesículas unilaminares pequeñas SUV (Small unilamellar vesicles)	20-100	
Vesículas unilaminares grandes LUV (Large unilamellar vesicles)	>100	
Vesículas unilaminares gigantes GUV (Giant unilamellar vesicles)	>1000	
Vesículas multilaminares MLV (Multilamellar vesicles)	>1000	

2.3 Interacción de liposomas en sistemas biológicos

Podemos distinguir cuatro mecanismos de interacción célula-liposoma por el cual los liposomas pueden liberar su contenido a las células (Figura 2-3). La ocurrencia de alguna de estas interacciones depende ampliamente de las características del liposoma como composición, tamaño y carga. Los mecanismos son los siguientes:

1. Adsorción del liposoma seguido de liberación extracelular del contenido liposomal y subsecuente transporte activo o pasivo de este contenido dentro de la célula.
2. Adsorción del liposoma seguido de transferencia selectiva de compuestos lipofílicos desde la bicapa liposomal a la membrana plasmática.
3. Internalización endocítica de los liposomas seguidos de una degradación del liposoma vía endolisosomal y subsecuente liberación intracelular del contenido liposomal.
4. Fusión de la membrana liposomal con la membrana plasmática o, intracelular con la membrana endosomal, de este modo libera el contenido liposomal en el citoplasma.

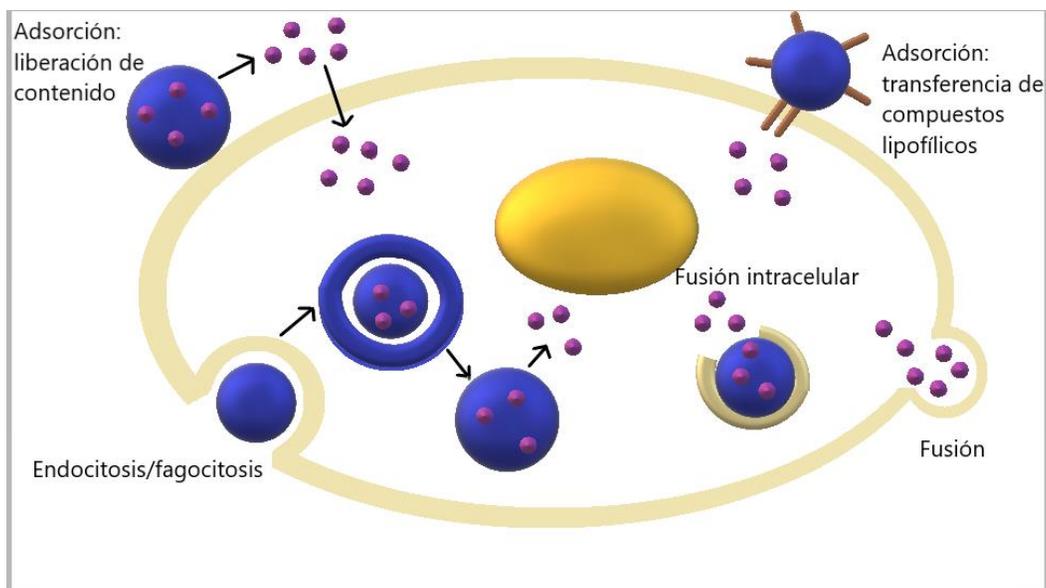


Figura 2-3. Posibles vías en las cuáles los liposomas pueden interactuar con la célula

Macrófagos del hígado y bazo, y también hepatocitos, han sido reconocidos *in vivo* por estar ampliamente involucrados en la captura de liposomas simples no dirigidos desde la sangre, mediados generalmente por receptores. Los liposomas administrados vía intravenosa son capaces de extravasar únicamente sitios en los cuales tengan endotelio discontinuo o fenestrado. El hígado y el bazo cumplen con esta característica, son órganos que almacenan a las poblaciones más grandes de macrófagos del cuerpo, lo que explica el importante rol de estos órganos en la conducción de los liposomas *in vivo*.

Generalmente, liposomas pequeños (≤ 100 nm) son eliminados de la sangre más lentamente que liposomas grandes, mientras que los liposomas eléctricamente cargados desaparecen rápidamente de la sangre en comparación a liposomas electrostáticamente neutros. (Torchilin, 2003)

Capítulo 3 Materiales

3.1 DSPC

Los lípidos con una cadena de longitud grande tienen mayor eficacia de encapsulación y estabilidad que los lípidos de cadena corta. (Aygün, Torrey, Kumar, & Stephenson, 2012). Considerando esto, en este estudio se empleó DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina o diestearoilfosfatidilcolina) para la fabricación de liposomas. Este lípido, (Figura 3-1) es una molécula lipídica sintética que tiene 18 átomos de carbono sin dobles enlaces entre ellos (18:0) (Chamati, Trobec, & Pavlic, 2016). Particularmente consiste en dos cadenas de ácido esteárico en las posiciones R_1 y R_2 .

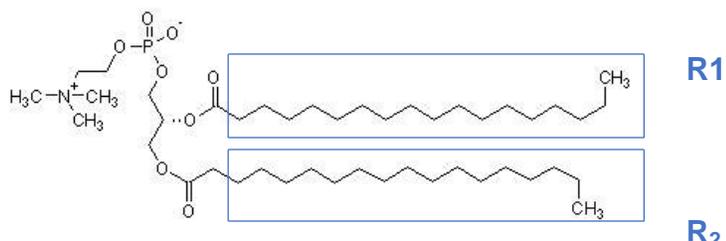


Figura 3-1. Molécula de DSPC

3.2 Colesterol

Una variante muy importante en la estructura liposomal, que sirve para preparar formulaciones liposomales más efectivas, es el contenido de colesterol (Goniotaki, Hatziantoniou, Dimas, Wagner, & Demetzos, 2004). Este esteroide natural es un esteroide (una combinación de esteroide y alcohol) y un lípido que se encuentra en las membranas celulares. La estructura molecular del colesterol incluye un anillo tetracíclico, con un solo grupo hidroxilo en el carbono 3, un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, y una cadena lateral isooctil hidrocarbonada en el carbono 17 (Figura 3-2). El grupo hidroxilo en el colesterol es muy importante, porque da al compuesto hidrofóbico su carácter anfifílico. Además, el grupo hidroxilo también puede mediar el enlace de hidrógeno del colesterol con agua y posiblemente con otros componentes lipídicos de las membranas de la célula (Ohvo-Rekilä, Ramstedt, Leppimäki, & Peter Slotte, 2002)

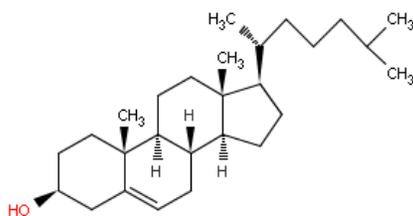


Figura 3-2. Molécula de colesterol

Numerosos estudios sobre el uso de colesterol como estabilizador demuestran que este esteroide puede aumentar el empaquetamiento de moléculas de fosfolípidos, reducir la permeabilidad de la bicapa a solutos electrolíticos y no electrolíticos y mejorar la resistencia de las vesículas a la agregación.(M. L. Briuglia, Rotella, McFarlane, & Lamprou, 2015)

3.3 Moléculas de interés biológico

El propóleo es una sustancia natural resinosa, recolectada por abejas de brotes y hojas de árboles y plantas, mezclado con polen y enzimas secretadas por las abejas. El uso de propóleos tiene una larga historia, precedida sólo por el descubrimiento de la miel, por poseer una amplia gama de propiedades

farmacológicas como antimicrobianas, antiinflamatorias, hepatoprotectores, antioxidantes y estimulantes del sistema inmune.

Se han identificado 300 compuestos, incluidos ácidos fenólicos, terpenos, ácido cinámico, ácido cafeico, varios ésteres y flavonoides.

Los flavonoides son uno de los grupos más importantes y pueden representar alrededor del 50% de la constitución del propóleo. Se cree que los flavonoides son responsables de muchas de sus actividades biológicas y farmacológicas. (Ju Yuan, Jiaguo Liu, YuanLiang Hu, Yunpeng Fan, Deyun Wang, Liwei Guo & Xiaojuan Zhao, Xu Liu, Cui Liu, 2012).

Los flavonoides contienen una estructura química característica C6-C3-C6 y se subdividen en subclases conocidas como flavonoles, flavonoides, antocianinas, flavanonas, flavonas y chalconas. (Figura 3-3) (Mcghie, 2013)

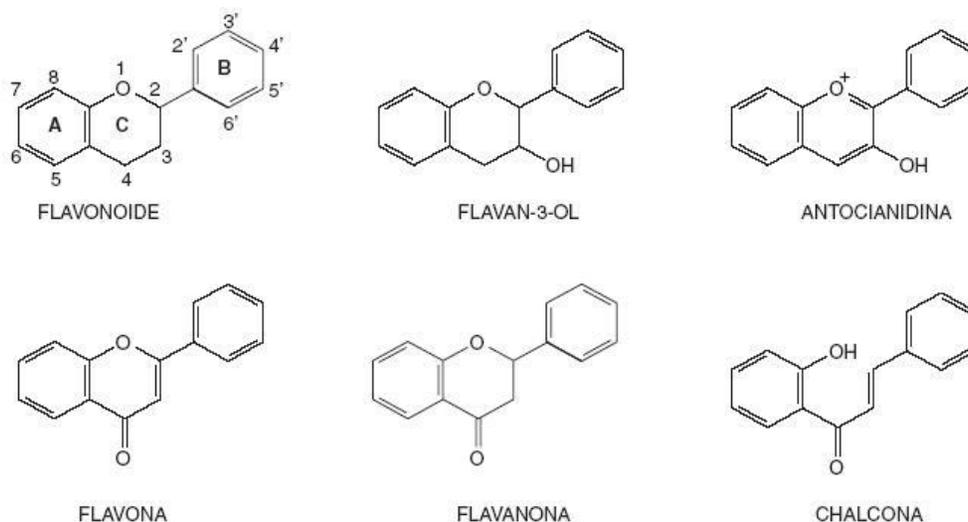


Figura 3-3. Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales

El cáncer es una de las enfermedades más comunes en el mundo, asociada con una alta tasa de mortalidad. Varios estudios, que van desde cultivos de tejidos y modelos animales hasta ensayos clínicos, demuestran la actividad anticancerígena de la miel. Hoy en día, los tratamientos para esta enfermedad

mortal dependen del tipo y la etapa del cáncer y la mayoría de las veces no son completamente exitosas ni efectivas. La miel cruda y / o los compuestos activos purificados de la miel muestran un efecto quimiopreventivo y una actividad anticancerígena contra diversas líneas y tejidos de células cancerosas *in vitro* (Goniotaki et al., 2004; Rasul et al., 2013). Se han sugerido diversos mecanismos de acción para explicar esta actividad, incluida la detención del ciclo celular, la inducción de apoptosis, la modulación del estrés oxidativo y la inmunomodulación (Ahmed & Othman, 2013).

3.3.1 Pinocembrina

La pinocembrina o 5,7-dihidroxi-flavanona, es uno de los flavonoides primarios aislado de diversas variedades de plantas (Figura 3-4) también se encuentra en altas concentraciones en distintos tipos de mieles (Oroian & Ropciuc, 2017). Además es el flavonoide quiral más abundante que se encuentra en el propóleo (Hanieh et al., 2017). Su amplia gama de actividades farmacológicas ha sido bien investigada, incluidas las actividades anticancerígenas (Rasul et al., 2013).

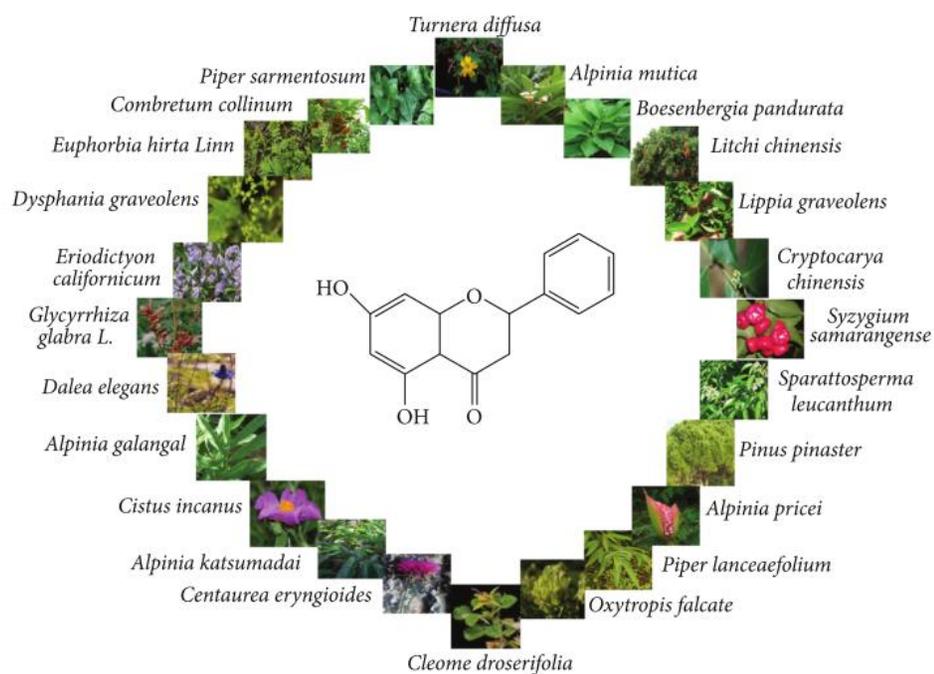


Figura 3-4. Estructura de pinocembrina y fuentes naturales de obtención

Estudios sugieren que existe una relación entre la estructura molecular de flavonoides y la interacción con bicapas lipídicas. Muchas propiedades biológicas de los flavonoides pueden estar relacionadas con su capacidad de penetrar en las membranas celulares y afectar su actividad biológica (Goniotaki et al., 2004), además que desempeñan un papel vital en la alteración de las cascadas de señalización celular (Selvaraj, Krishnaswamy, Devashya, Sethuraman, & Krishnan, 2015).

La pinocembrina ha demostrado citotoxicidad contra ciertas líneas celulares de cáncer, como la línea celular de cáncer de colon (HCT116), con relativamente menos toxicidad hacia las células endoteliales del cordón umbilical humano. Otros estudios *in vivo* e *in vitro* revelan que la pinocembrina puede proteger contra la hepatocarcinogénesis inducida por productos químicos, lo que sugiere que el efecto estimulante de este compuesto podría deberse a la peroxidación lipídica. Los detalles de toda la información con respecto a los objetivos moleculares de pinocembrina en diferentes tipos de cáncer se registran en la Tabla 3-1. (Rasul et al., 2013)

Tabla 3-1. Blancos moleculares de Pinocembrina en diferentes tipos de cáncer

Tipos de cáncer	Líneas celulares	IC ₅₀ /Concentración	Blancos principales
Colon	HTC-116, HTC-29	26.33-143.09 µg/mL 1.6-13.6 µM	Radical anión superóxido↓, BaX↑, NO ₂ ↓
Leucemia	HL-60	<100 ng/mL	Fas↑, caspasa-3/8/9↑
↑ Alta regulación		↑Baja regulación	

No obstante, la aplicación de pinocembrina en la práctica clínica está muy limitada por su baja solubilidad en agua (parcialmente soluble en etanol) (Sigma-Aldrich) y biodisponibilidad (Ju Yuan, Jiaguo Liu, YuanLiang Hu, Yunpeng Fan, Deyun

Wang, Liwei Guo & Xiaojuan Zhao, Xu Liu, Cui Liu, 2012). En el presente estudio, se pretende mejorar tales aspectos con su incorporación dentro de un liposoma.

3.3.2 Resazurina

El ensayo de reducción de resazurina, se ha utilizado en estudios para evaluar la citotoxicidad de flavonoides contra líneas celular de cáncer multiresistentes a fármacos, en concentraciones de 500 µg/mL. (Kuate et al., 2015).

La prueba ideal para la proliferación celular *in vitro* y la citotoxicidad debe ser simple, rápida, eficiente, confiable, sensible, segura y rentable sin interferir con el compuesto que se probará. Características que se obtienen empleando resazurina, además de ser una molécula no tóxica para las células. Esta molécula altamente hidrofílica (soluble en agua y etanol) (Sigma-Aldrich) se ha utilizado durante décadas para medir la proliferación y la citotoxicidad en células procariotas y eucariotas. En las células metabólicamente activas, este colorante azul no fluorescente se reduce por actividad celular (probablemente por consumo de oxígeno a través del metabolismo) a resorufina, un compuesto rosado y altamente fluorescente, que permite una medición cuantitativa de la viabilidad celular (Figura 3-5). Aunque se ha postulado arbitrariamente que es reducido por las enzimas mitocondriales, no se sabe si esto ocurre intracelularmente, en la superficie de la membrana plasmática o simplemente en el medio como una reacción química (O'Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000).

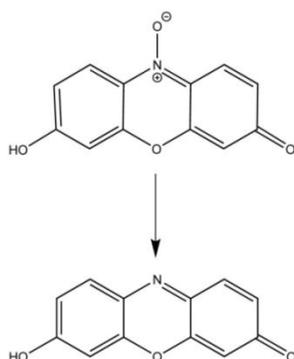


Figura 3-5. Estructura química y reducción de resazurina a resorufina.

Capítulo 4 Técnicas

4.1 Método de obtención de liposomas

En este estudio se utiliza la técnica de hidratación de película, cuyos pasos para la obtención de SUVs [Small Unilamellar Vesicles] son (Patil & Jadhav, 2014):

a) Disolución del lípido en medios no polares y rotaevaporación. El disolvente (en este estudio diclorometano y cloroformo) que contiene disuelto al lípido se evapora mediante una bomba de vacío, obteniéndose una fina película formada por la bicapa lipídica. Además, las moléculas hidrofóbicas disueltas quedaran retenidas en la película (pinocembrina y colesterol).

b) Hidratación de la bicapa lipídica y dispersión en medios polares como agua. La hidratación debe hacerse por encima de la temperatura de transición del lípido durante 30 minutos y con ayuda de un agitador mecánico (sonicador). De esta forma, parte del agua y las moléculas hidrofílicas (resazurina) quedan inmersas en el interior del liposoma, el cual se forma espontáneamente en contacto con la disolución acuosa. Los liposomas obtenidos de esta forma son fundamentalmente SUV pero como se forman espontáneamente, no existe un control directo del tamaño obtenido, por ello hay que utilizar posteriormente la técnica de la extrusión para que el tamaño de los liposomas sea más homogéneo (Figura 4-1).

c) En la extrusión, las vesículas unilamelares y multilamelares se hacen pasar por un filtro de policarbonato de un tamaño de poro definido, en el que al final quedarán retenidas únicamente las bicapas que no han formado vesículas; la mayoría de los liposomas de la disolución así obtenidos serán unilamelares.

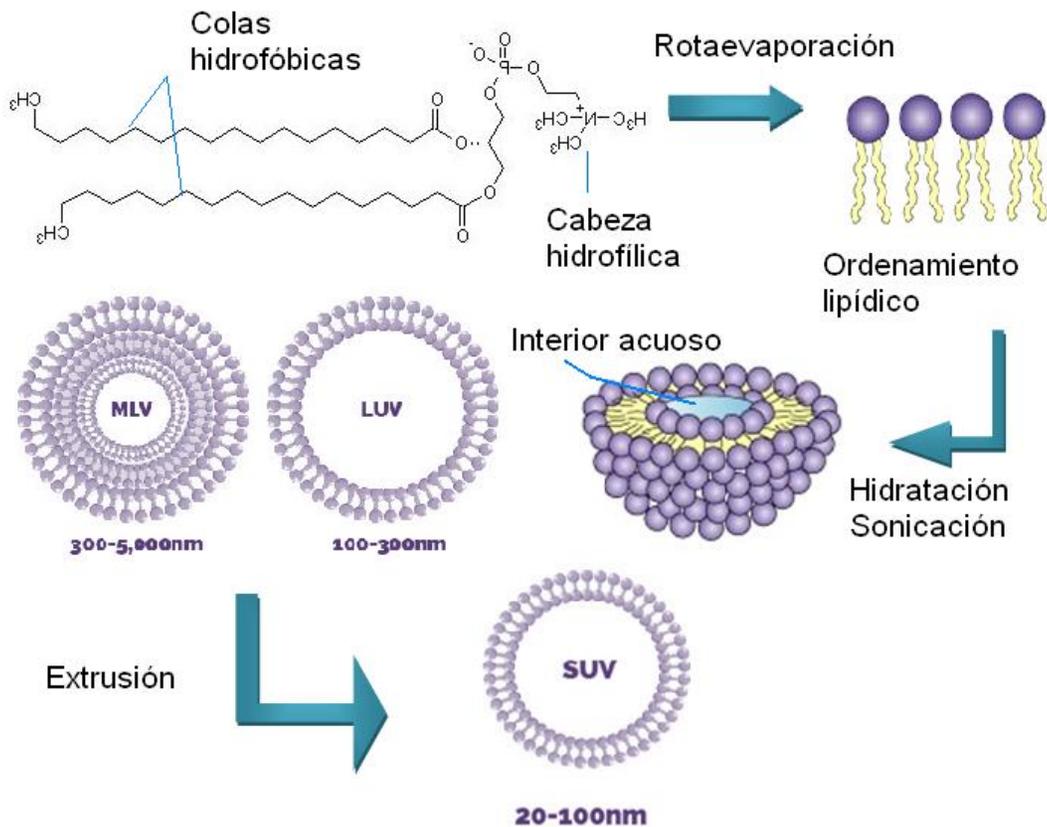


Figura 4-1. Representación molecular de obtención de liposomas con método de hidratación de película.

4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés, Differential Scanning Calorimetry) es una técnica que involucra la medición de la respuesta de una muestra a una señal de calor o enfriamiento aplicados. Se puede usar para medir la estabilidad intramolecular de un amplio espectro de biomoléculas, que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sistemas micelares.

En el equipo de DSC se dispone de dos celdas, una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra, generalmente, contiene el medio de reacción (celda de referencia). Se usan calefactores para cada celda y un sistema de control prueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia. Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas celdas. Es decir, cuando

tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas celdas. (Suriñach, Baro, Bordas, Clavaguera, & Clavaguera Mora, 1992)

Hay 2 tipos de instrumentos DSC (Figura 4-2): compensación de potencia y flujo de calor. (Torchilin & Weissig, 2003). En resumen, todos los instrumentos son de diseño doble (celda de muestra y de referencia), y las medidas son diferenciales (midiendo la diferencia entre las señales de la muestra y el de referencia). Esto sirve para aumentar la sensibilidad.

A) Los instrumentos de conducción de calor (o flujo de calor) generalmente usan termopares entre las celdas y el entorno (disipador de calor). Cuando el sistema se altera, el calor fluye (entra o sale) hasta que se alcanza nuevamente el equilibrio térmico. La muestra y la referencia se calientan a la misma velocidad de una sola fuente de calentamiento. La diferencia de temperatura entre las celdas se registra y se convierte en una diferencia de potencia (ΔP). Esta diferencia de potencia da la diferencia en el flujo de calor a través de:

Ecuación 4-1

$$\Delta P = \frac{\Delta Q}{dt}$$

Donde ΔQ es la diferencia de calor, dt es la diferencial de temperaturas de la muestra y referencia respectivamente.

La variable utilizada para seguir la reacción es, por lo tanto, la diferencia de potencial eléctrico generada por los termopares.

B) En los instrumentos de compensación de potencia, se suministra una potencia constante a cada calentador de la celda de muestra y de referencia, que puede aumentar o disminuir para mantener la diferencia de temperatura entre las celdas cercanas a cero. Las temperaturas de la celda se controlan usando termopares unidos a las plataformas del disco. Los termopares están conectados en serie y miden el flujo de calor diferencial ($\frac{dq}{dt}$) usando el equivalente térmico de la Ley de Ohm:

Ecuación 4-2

$$\frac{dq}{dt} = \frac{\Delta T}{R_D}$$

Donde ΔT es la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia y R_D es la resistencia térmica de la plataforma del disco.

En este caso, la variable utilizada para seguir los experimentos es la potencia diferencial suministrada.

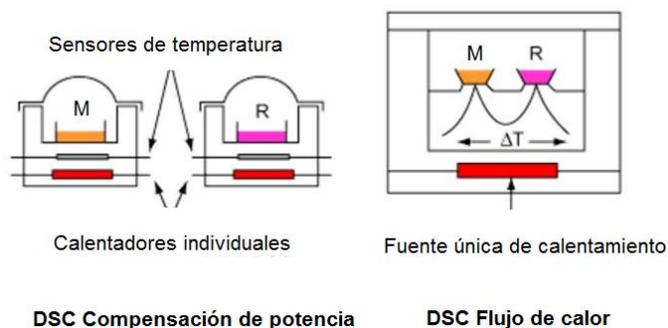


Figura 4-2. Tipos de DSC: Compensación de potencia y flujo de calor

En estos experimentos, el equipo usado es MicroCal VP-DSC, mostrado en la Figura 4-3, es del tipo de compensación de potencia. Las celdas de referencia y de muestra se fijan en recipientes con forma con volúmenes efectivos de 0.5 mL. Las celdas están construidas con una aleación de tántalo y sobresalen de la cámara adiabática a través de sus tubos de acceso. En general, un evento exotérmico (calor liberado) en la celda de muestra hará que la señal de diferencia de potencia se desvíe en la dirección negativa. Del mismo modo, un evento endotérmico (calor absorbido) en la celda de muestra hará que la señal se desvíe en la dirección positiva. El potencial diferencial entre las celdas de referencia y muestra, la diferencia de temperatura entre las celdas y la camisa adiabática, la presión de la celda establecida por el sistema de presurización autónomo y la potencia del disipador de calor constituyen las entradas analógicas, que están controladas por dos placas que residen dentro de una computadora.

Además, este equipo está conectado a un desgasificador de muestra mediante vacío de 14 psi (ThermoVac), que utiliza pequeñas barras magnéticas de agitación para mantener la muestra a determinada temperatura.

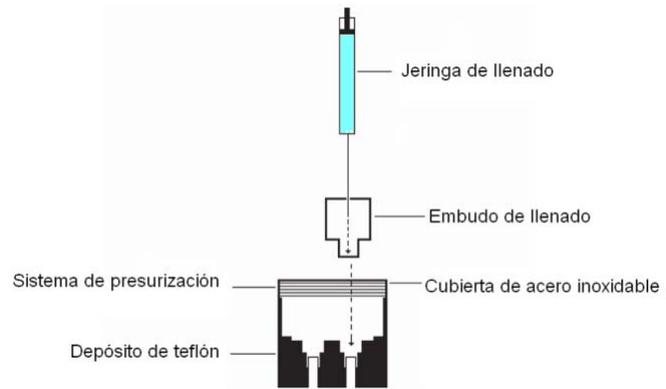


Figura 4-3. Calorímetro MicroCal VP-DSC

4.2.1 Aplicaciones de DSC

La calorimetría diferencial de barrido implica aplicaciones como: caracterización térmica de procesos complejos (desnaturalización de proteínas; transición vítrea de polímeros, transición de fase de las membranas lipídicas y bicapas de fosfolípidos) y determinación del efecto de la hidratación, pH, disolvente. Esta caracterización es importante para el desarrollo de liposomas como portadores de fármacos.

La calorimetría diferencial de barrido mide el flujo de calor que ingresa o se libera por un material. A partir de eso, se puede calcular la capacidad calorífica a presión constante (C_p). Las unidades de capacidad calorífica son $\text{cal } ^\circ\text{C}^{-1}$. Determina la cantidad de entrada de calor (q) requerida para elevar la temperatura de una muestra en un grado Celsius a presión constante. La capacidad calorífica normalmente se normaliza dividiendo C_p de la muestra entre el número de mol, para obtener el calor necesario para elevar un mol de muestra en un grado Celsius. Esto corresponde entonces a la capacidad calorífica específica. La capacidad de calor se define por:

Ecuación 4-3

$$C_p = \frac{\partial q}{\partial T_p}$$

Donde T es la temperatura y q es la entrada de calor.

Si la temperatura cambia de T_0 a T_1 , la entalpía de la reacción (ΔH) es:

Ecuación 4-4

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT$$

Para las transiciones de fase, como la transición principal de las bicapas de fosfolípidos, que ocurre entre el estado de gel (ordenado) a estado fluido o líquido-cristalino (desordenado) cuando se agrega energía térmica, se afectan las interacciones de Van der Waals entre las cadenas de hidrocarburos, aumentando su movilidad.

La cantidad de energía que se proporciona, se asocia la transición de fase de los fosfolípidos y con las propiedades de conformación. La temperatura de transición (T_m), es donde ocurre la transición de fase de los fosfolípidos y el cambio del estado gel a líquido-cristalino. El valor de la entalpía para la transición de fase se determina integrando el área debajo del pico, según la Ecuación 4-4. Estos cambios de entalpía corresponden a cambios en la capacidad calorífica ($C_{p_{\max}}$) de los fosfolípidos durante el proceso de transición del gel a la fase cristalina líquida.

La medición de T_m proporciona una indicación rápida y fácil de estabilidad. Cuanto mayor es T_m , más estable es la biomolécula. El análisis de transición de fase (Figura 4-4) en los liposomas es necesario porque el estado de fluidez de las bicapas es un determinante importante en la estabilidad *in vitro* e *in vivo*, en perfiles de liberación de fármacos.

La temperatura que corresponde a la mitad del cambio de entalpía durante la transición es $T_{1/2}$, mientras que $\Delta T_{1/2}$ es el ancho de la transición a la mitad de la altura máxima. (Demetzos, 2008)

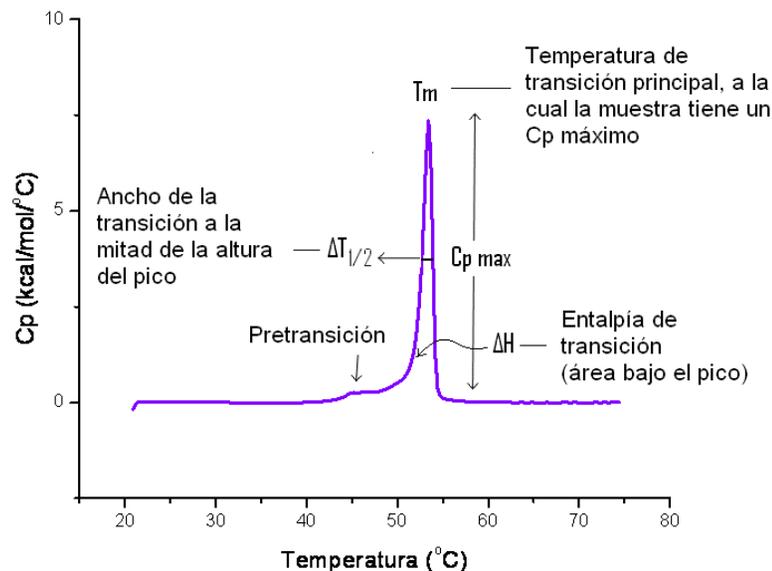
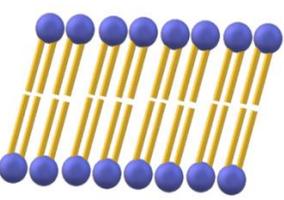
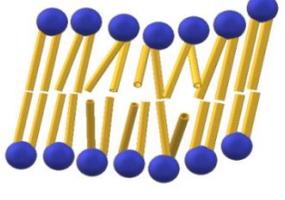
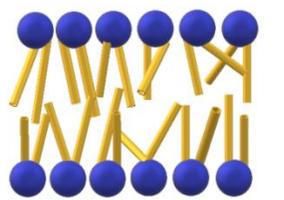


Figura 4-4. Perfil de transición de fase de liposoma de DSPC

Durante el calentamiento, el estado gel de los lípidos experimenta la pretransición al estado gel "ondulado". La pretransición (T_p) ocurre entre 5-10°C debajo de la transición principal, con una pequeña entalpía y puede ser debida a la rotación de las cabezas polares o movimiento cooperativo de la cadena de hidrocarburos antes de la fusión. La temperatura de transición principal es ampliamente determinada por la cabeza polar junto con la longitud y el grado de insaturaciones de las cadenas de carbono y son caracterizadas por un cambio en el desorden rotamérico de cadenas de hidrocarburos (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Representación de acomodo molecular de la bicapa lipídica de liposomas en el proceso de transición de fase

Estado gel	Estado ondulado	Estado líquido-cristalino
		
$T < T_p$	$T_p < T < T_m$	$T > T_m$

Si suponemos que el sistema de interés puede existir en cualquiera de dos estados distintos (A y B) en algún rango de temperatura, la concentración de equilibrio de las dos formas se puede escribir en términos de una constante de equilibrio:

Ecuación 4-5
$$K = \frac{[B]}{[A]}$$

Por lo tanto, si la fracción del estado B, el estado de entalpía más alto (f), entonces:

Ecuación 4-6
$$K = \frac{f}{1-f} \therefore f = \frac{K}{1+K}$$

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

Ecuación 4-7
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K$$

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

Cuando ΔG° es cercano a cero, el sistema existe como una mezcla de los dos estados. La temperatura a la cual los dos estados son igualmente probables es decir, T_m , la diferencia de energía de Gibbs entre los dos estados es cero. Por lo tanto, es posible calcular la entropía (ΔS°), dada por:

Ecuación 4-8
$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ} \therefore \Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T_m}$$

4.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

4.3.1 Tamaño

El principio de la dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering) explica el fenómeno físico de difusión, donde las partículas están en constante movimiento aleatorio (movimiento browniano), y se difunden a una velocidad relacionada con su tamaño. Al medir la velocidad de difusión, se observa el patrón de moteado producido al iluminar las partículas con un láser; esto sucede debido al fenómeno físico de dispersión de la interacción radiación-materia. En la Figura 4-5, se muestra el plano de dispersión dado por la radiación incidente (I_i) y la radiación dispersada (I_d), relacionadas mediante el ángulo de dispersión (θ). La intensidad de dispersión de la muestra varía con el tiempo (Panalytical, 2018)

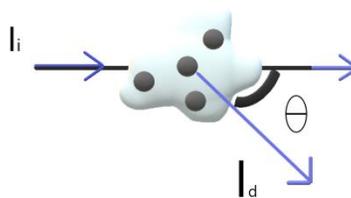


Figura 4-5. Fenómeno físico de la dispersión de la luz

Por consiguiente, si se mantiene una pantalla cercana a una partícula que dispersa luz en todas direcciones, esta pantalla puede ser iluminada por esa luz dispersada. Debido a la presencia de miles de partículas en un sistema de estudio, la pantalla muestra patrones de manchas que consisten en áreas brillantes y oscuras. (Figura 4-6).

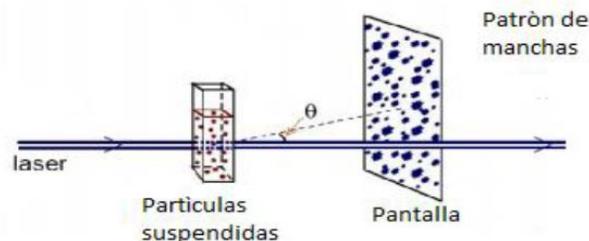


Figura 4-6. Patrón de manchas obtenidas por dispersión de luz

Dado que las partículas están en constante movimiento, el patrón de manchas también se mueve, provocando que las áreas brillantes y oscuras crezcan y disminuyan en intensidad, entonces lo que se mide son fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada, usando un detector de fotodiodo de avalancha sensible (APD) (Figura 4-7). La rapidez a la cual estas fluctuaciones de intensidad ocurren depende del tamaño de partículas: las partículas grandes tendrán mayor intensidad de fluctuación que las partículas pequeñas.

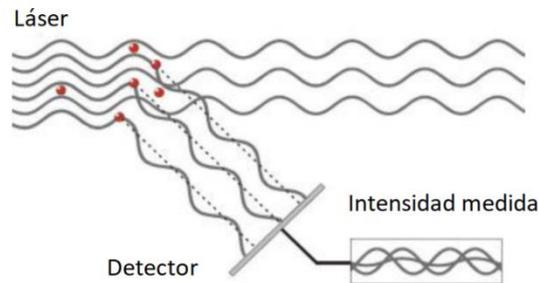


Figura 4-7. Fluctuaciones de luz dispersada incidiendo en el detector

Los cambios de intensidad se analizan con un autocorrelacionador digital, acoplado al equipo utilizado (Zetasizer μ V), que genera una función de correlación. Esta curva se puede analizar para determinar tamaño y la distribución estadística (Figura 4-8).

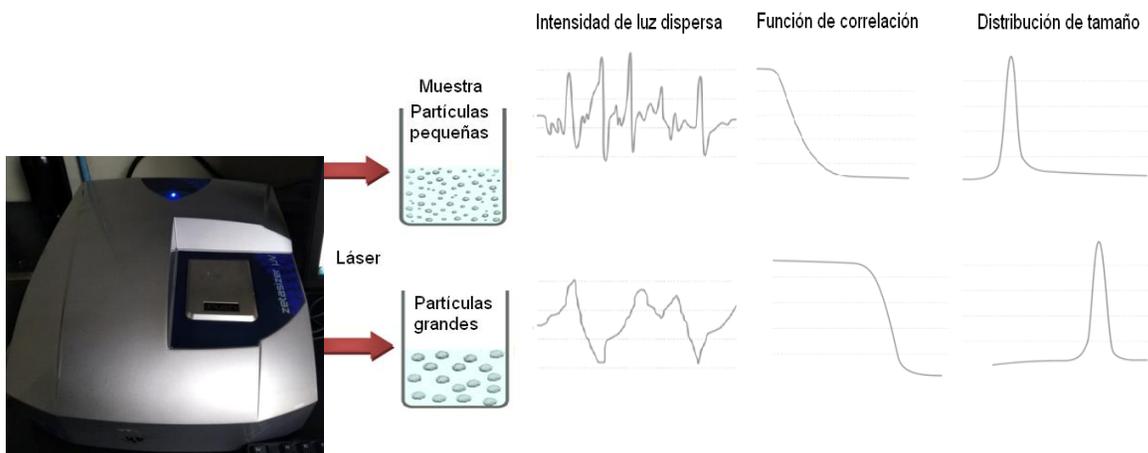


Figura 4-8. Correlación de intensidad de luz dispersa y distribución de tamaño en Zetasizer μ V

La función de correlación dada por el tiempo de separación es descrita matemáticamente por la siguiente ecuación:

Ecuación 4-9
$$G(t) = \langle n \rangle^2 (1 - Be^{-\Gamma t})$$

En la cual, n es la intensidad de la señal promediada durante muchos tiempos de muestreo, B es una constante determinada por restricciones mecánicas del aparato y el procedimiento de muestreo, Γ es la constante de desintegración, que se calcula como $2DK^2$, donde K es el vector de dispersión (dependiente del ángulo de detección) y D es el coeficiente de difusión de las partículas que causan la fluctuación.

Habiendo obtenido el valor del coeficiente de difusión, el radio de la partícula puede ser determinado sustituyendo D en la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 4-10), la cual refiere que para el coeficiente de difusión de una partícula esférica de radio (a) en un fluido de viscosidad dinámica (μ) a temperatura absoluta (T) es:

Ecuación 4-10
$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\mu a}$$

Donde R es la constante de los gases ideales y N_A es el Número de Avogadro.

4.3.2 Potencial Z

Supongamos la presencia de un coloide negativo, éste tenderá a atraer algunos iones positivos que formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la “capa de Stern”. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una “capa difusa” de contra-iones.

En la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que el coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al

alejarse del coloide, mientras que las fuerzas repulsivas del coloide son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio.

La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera de cargas rodeando al coloide. A cualquier distancia de la superficie, la densidad de carga es igual a la diferencia de concentración entre iones positivos y negativos. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan.

Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que juntos llamaremos “la doble capa”. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución (Rho, Chon, & Cho, 2018).

El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia desde el coloide es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego (Figura 4-9).

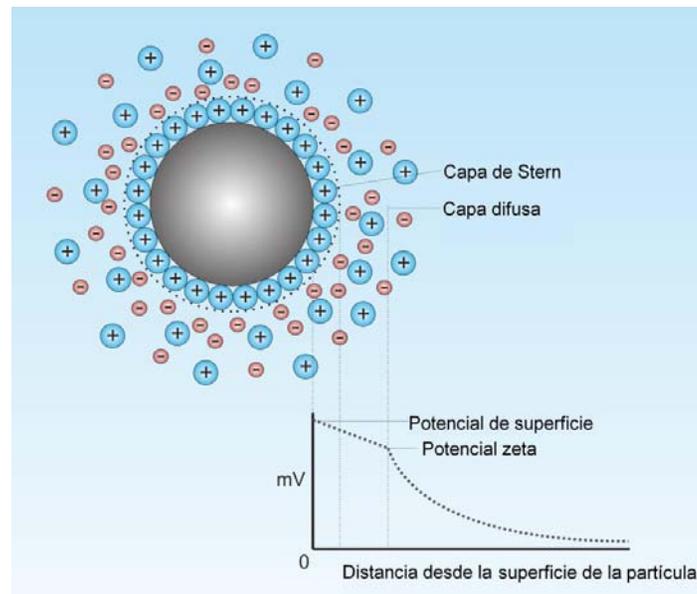


Figura 4-9. Potencial Z

Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el “potencial Z”. La carga o el potencial Z de las partículas y moléculas se determina midiendo su velocidad de movimiento durante una electroforesis. Dos electrodos colocados en los extremos de la cámara son conectados a una fuente de poder, creándose un campo eléctrico que cruza la celda. Los coloides cargados migran en el campo y su movimiento y dirección están relacionados con su potencial Z. La velocidad con la que se mueven es proporcional a la intensidad del campo y su potencial Z. Lo anterior se relaciona con la siguiente ecuación:

Ecuación 4-11
$$v_e = \mu_e E_e$$

Donde v_e es la velocidad que adquieren las partículas, E_e es el campo eléctrico aplicado y μ_e la movilidad electroforética.

Si se conoce la intensidad del campo, se mide la velocidad del movimiento, usando la electroforesis Doppler (compara la diferencia de frecuencia entre la luz difundida y la luz incidente (haz de referencia) para determinar la movilidad de las partículas, gracias a la influencia del campo eléctrico que se aplica), y luego aplicamos las teorías establecidas para calcular el potencial Z. (Figura 4-10)

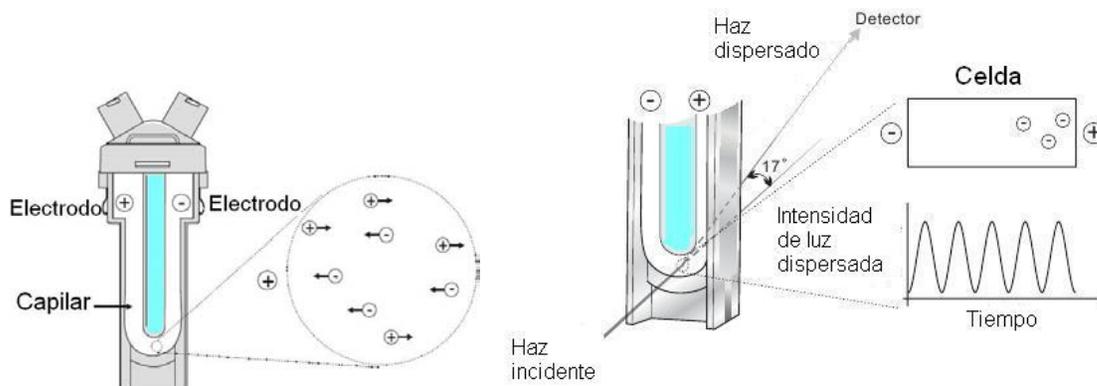


Figura 4-10. Representación de electroforesis Doppler y movimiento de iones hacia los electrodos cuando se aplica un campo eléctrico.

En el equipo utilizado en este estudio (Zetasizer Nano), sólo el haz de difracción pasa a través de la celda y el haz de referencia se conduce por fuera de la celda (Figura 4-11). El haz de referencia tiene la misma frecuencia y fase que el haz del láser. Las partículas de la celda de difracción pasan por el haz del láser y la luz difractada tendrá cambios de frecuencia según la velocidad de las partículas. (Panalytical, 2018)

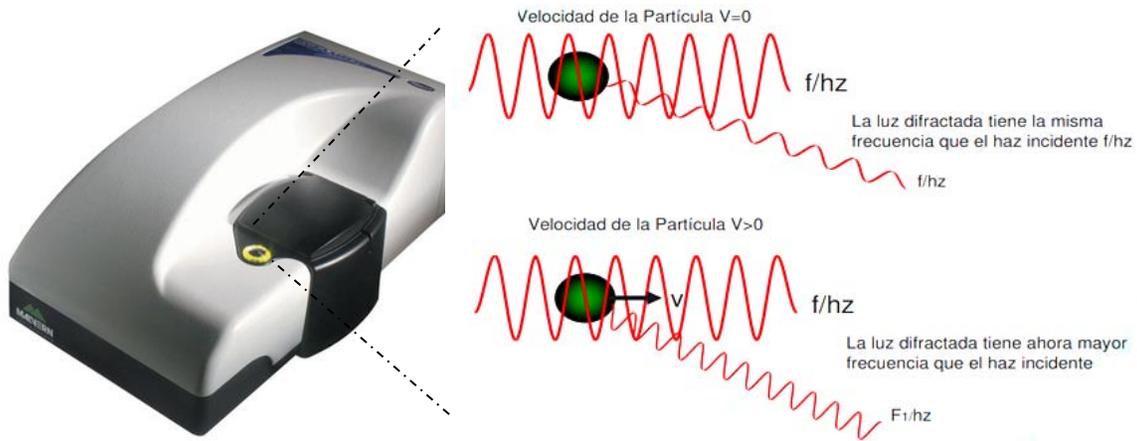


Figura 4-11. Diferencia de frecuencia según la velocidad de la partícula.

La medición del potencial Z permite hacer predicciones sobre la estabilidad de almacenamiento de una dispersión coloidal; cuanto mayor es el potencial Z, más probable es que la suspensión sea estable porque las partículas cargadas se repelen entre sí y así superan la tendencia natural a agregarse. Actualmente se admite que los potenciales entre $|5|$ y $|15|$ mV están en la región de floculación limitada y entre $|5|$ y $|3|$ mV, de floculación máxima (Heurtault, Saulnier, Pech, Proust, & Benoit, 2003).

4.4 Ultrafiltración por centrifugación

La ultrafiltración por centrifugación es un método que se aplica en laboratorios farmacéuticos, ingeniería de alimentos, tratamiento de agua para la concentración, purificación y lavado de diversos coloides (proteínas, ADN, nanopartículas, extractos).

Este método consiste en que la muestra líquida (por ejemplo, suspensión de nanopartículas, liposomas o solución de polímeros) se somete a filtración bajo

aceleración centrífuga constante, donde la fuerza impulsora es la presión que se crea por muestra, en la celda de filtración, y depende de la velocidad de rotación centrífuga. La altura de la columna de la muestra disminuye con la formación de filtrado y hay una retención de moléculas por la membrana que resulta en una formación de un agregado o “*cake*” durante la centrifugación (Loginov et al., 2017).

Como la masa de una molécula típica de fármaco es aproximadamente 5 órdenes de magnitud menor que la masa de un liposoma, la velocidad de sedimentación del fármaco libre es despreciable en comparación con la velocidad de sedimentación de las nanopartículas. Cuando las moléculas absorben en la región espectral UV-VIS, dan como resultado una absorbancia del fármaco libre. La señal de absorción da información sobre la proporción de fármaco libre (fuera de los liposomas) en comparación con la señal correspondiente a la fracción de sedimentación de las nanopartículas (Mehn et al., 2017).

Las membranas de los filtros Amicon®, utilizados en este estudio, se caracterizan por un tener límite de peso molecular nominal (NMWL); es decir, su capacidad para retener moléculas por encima de un peso molecular especificado. Es recomendable usar una membrana con un NMWL al menos dos veces más pequeño que el peso molecular del soluto que se pretende analizar. El tiempo típico de ultracentrifugación es de 10 a 30 minutos dependiendo del NMWL (Figura 4-12).

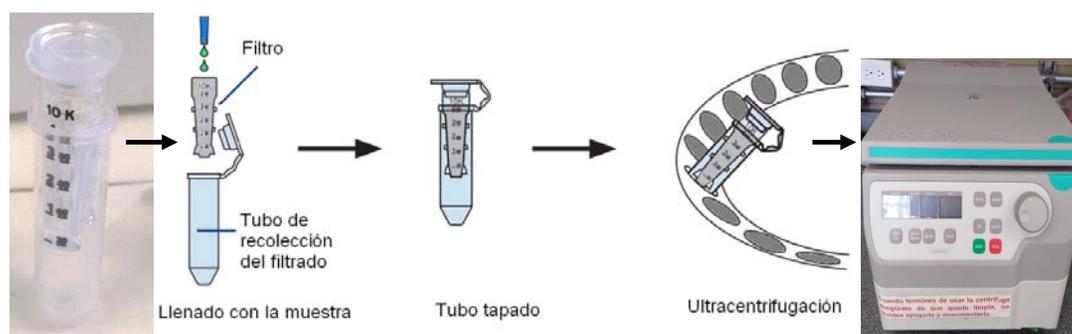


Figura 4-12. Procedimiento de ultrafiltración

Para recuperar eficientemente la muestra concentrada, es decir, recuperar la especie retenida en el filtro, se utiliza la centrifugación inversa (Figura 4-13), que

es conveniente obtener después de recoger el filtrado. La centrifugación inversa consiste en voltear el filtro, reconstituyendo el concentrado al volumen original de la muestra y colocando el filtro invertido en el tubo de recolección, usando 1000 rpm por gramo durante 2 minutos para transferirlo al tubo de recolección (UserGuideAmicon®)

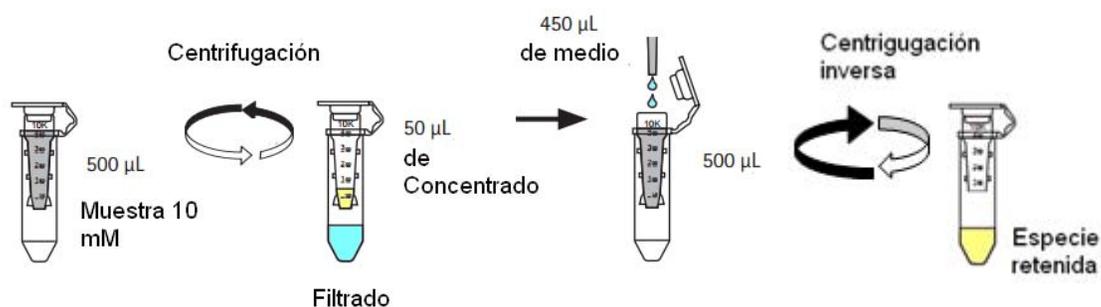


Figura 4-13. Recuperación de especie retenida por centrifugación inversa

4.5 Espectrofotometría UV-VIS

La espectrofotometría es una técnica usada con moléculas disueltas en un solvente, que mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética para obtener mediciones cuantitativas.

La luz que se encuentra en la luz visible y la luz ultravioleta de los espectros electromagnéticos presenta una energía de 150- 400 kJ/mol. La energía de la luz es usada para promover electrones de un estado de excitación a otro. Un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud. Moléculas con electrones deslocalizados en sistemas aromáticos a menudo absorben la luz a 150-400 nm (ultravioleta) o en la región visible de 400-800 nm. Cuando una onda encuentra a una molécula, cambiar su dirección de propagación (dispersión) de esa onda o es absorbida.

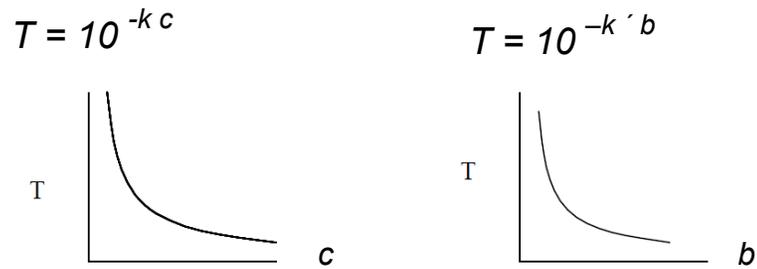
Para realizar una identificación, generalmente se hace incidir sobre la sustancia estudiada radiaciones electromagnéticas de diferente energía. Normalmente se estudia un rango de radiaciones y se va aumentando (o disminuyendo) la longitud de onda de las radiaciones incidentes desde un extremo del rango hasta el

extremo opuesto. Así se obtiene un espectro de absorción de la sustancia, que se puede representar gráficamente. La cantidad de radiación electromagnética absorbida por un analito se relaciona cuantitativamente con la concentración de dichas sustancias en solución.

La transmitancia (T) se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la disolución. Si la potencia radiante que incide sobre la disolución es P_0 y P la potencia radiante que se transmite, entonces:

Ecuación 4-12
$$T = \frac{P}{P_0}$$

Se observa en la Gráfica 4-1 que la potencia de la energía transmitida disminuye exponencialmente con la concentración C y con la distancia b recorrida a través de la disolución:



Gráfica 4-1. Relación entre energía transmitida y concentración o distancia

Donde k y k' son constantes de proporcionalidad; combinando ambas y aplicando logaritmos, se obtiene la expresión matemática de la Ley de Beer que indica la relación directa entre la absorbancia de un analito y su concentración en disolución:

Ecuación 4-13
$$-\text{Log } T = a \cdot b \cdot c = A$$

Cuando se usan unidades molares se llama absortividad molar (ϵ) y se expresa en L/mol·cm.

La probabilidad de absorción en una longitud de onda está caracterizada por el coeficiente de absorción molar a esa longitud de onda. Si la luz de intensidad I_0

pasa a través de una sustancia de espesor d (en cm) y concentración molar C , la intensidad de la luz transmitida obedece la Ley de Lambert-Beer:

Ecuación 4-14
$$\text{Log } \frac{I}{I_0} = -\epsilon dc$$

Donde ϵ es el coeficiente de absorción molar o también denominado coeficiente de extinción molar.

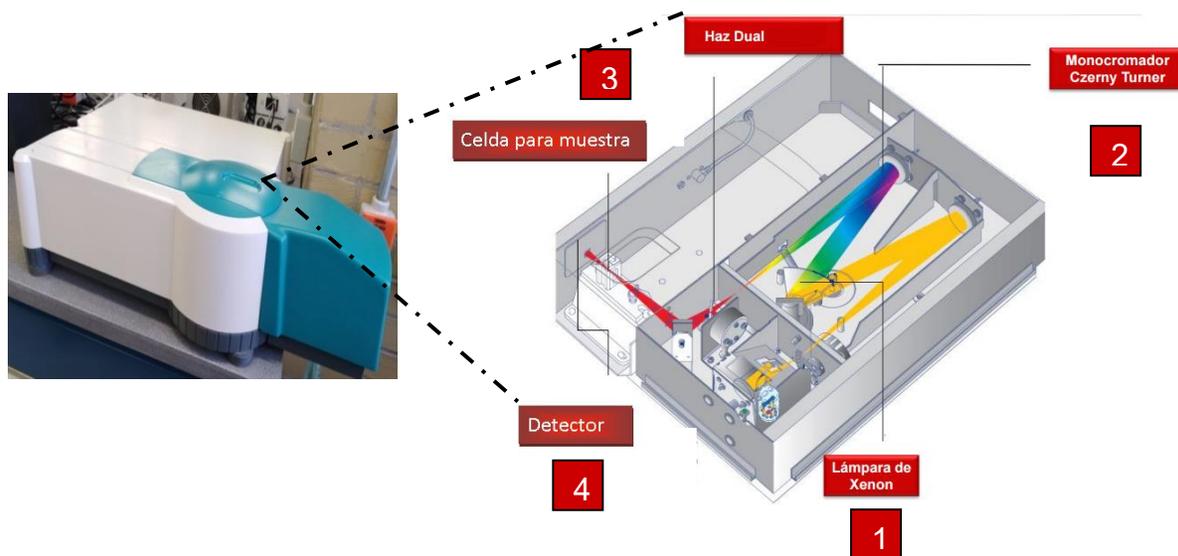


Figura 4-14. Foto y esquema de espectrofotómetro

En el presente trabajo se utilizó el espectrofotómetro Cary 50 BioVarian, que es un equipo que consiste en un filtro del monocromador que selecciona un rango de longitudes de onda de la fuente de radiación para ser enviada a la muestra en el mismo compartimento; la radiación transmitida es detectada con un tubo al vacío, un tubo fotomultiplicador o fotodiodo y convertida a una señal por un procesador de señales. Los componentes del equipo son los siguientes (Figura 4-14):

1. Fuente de radiación: es una lámpara de Xenón que provee una radiación continua adecuada del espectro UV/VIS (190–1100 nm)
2. Filtro: Un monocromador Czerny-Turner (Figura 4-15) separa espacialmente la luz policromática en una serie de rayos monocromáticos. Consiste en un espejo esférico colimador de luz, una rejilla de difracción plana y un espejo flexible que enfoca la luz dispersa.

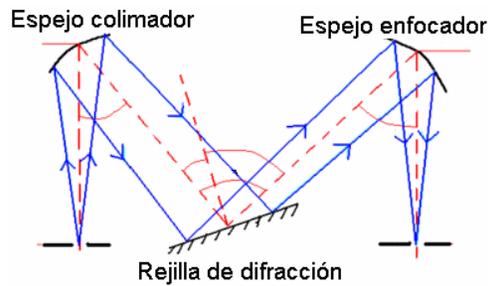


Figura 4-15. Representación de monocromador Czenry-Turner

3. Portamuestra: Un soporte de microceldas se encuentra en el equipo Cary 50.
4. Detector fotométrico: Dos detectores de diodo de silicio permiten mediciones precisas de muestras de baja concentración.
5. Procesador de la señal y lectura: El detector da una señal que contiene información sobre el poder de radiación transmitido por la solución de la muestra. La señal es procesada por un hardware o software CaryWinUV para extraer la información deseada y para convertirla a una forma conveniente de lectura.

La importancia de esta técnica en el estudio es que la molécula de pinocembrina presenta un espectro UV típico de flavonoides con máximos de absorción a 290 nm, mientras que la resazurina muestra un pico de absorción a 610 nm, siendo posible determinar cuantitativamente su concentración en el liposoma mediante el cálculo de eficiencia de incorporación o encapsulación.

4.5.1 Eficiencia de incorporación

La eficiencia de incorporación se refiere exclusivamente a la carga de compuestos anfílicos o lipofílicos que se asocian con la bicapa lipídica y se define por la concentración del material incorporado (tales como ingredientes activos, fármacos, fragancias, proteínas, pesticidas, agentes antimicrobianos, etc.) sobre la concentración inicial utilizada para preparar la formulación. La molécula cubierta por un lípido o polímero, puede solubilizarse en el algún disolvente y se puede cuantificar.

La ecuación correspondiente de la eficiencia de incorporación (%EI) en este estudio para la determinación de pinocembrina en liposomas es:

Ecuación 4-15

$$EI = \frac{[Pinocembrina]_{total} - [Pinocembrina]_{no\ retenida}}{[Pinocembrina]_{total}} \cdot 100$$

4.5.2 Eficiencia de encapsulación

La encapsulación es un proceso de encerrar o atrapar un material (moléculas hidrofílicas) dentro de una matriz sólida o líquida, con el propósito de controlar la liberación, inmovilización o aislamiento del material encapsulado.

El porcentaje de encapsulación (%EE) se define como la cantidad del material capturado en el centro acuoso en relación con la cantidad total de material agregado durante el proceso de encapsulación.

En este estudio, la determinación de encapsulación de resazurina se define por la siguiente ecuación:

Ecuación 4-16

$$EE = \frac{[Resazurina]_{retenida}}{[Resazurina]_{total}} \cdot 100$$

4.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica utiliza un haz de electrones para escanear y magnificar superficies. En la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy), las imágenes de primer plano son conocidas por su detalle, profundidad de campo y sombras que le dan al espectador claridad, perspectiva y apariencia tridimensional.

El microscopio electrónico de barrido (Figura 4-16) utiliza un cañón de electrones y un sistema de lentes condensadores para enfocar los electrones en la muestra. El cañón de electrones, que se opera entre mil y treinta mil voltios, es un filamento calentado que proporciona una fuente de electrones para el rayo de prueba.

A medida que los electrones salen de la pistola a través de su abertura, son enfocados y dirigidos por campos electromagnéticos que actúan como lentes. No se usan lentes de vidrio, ya que interferirían con el haz. Debido a que los electrones en movimiento generan sus propios campos magnéticos, los electroimanes se pueden usar para controlar la ruta del haz. Las placas con carga eléctrica también se pueden usar para producir campos que dirigen el haz. Estos campos magnéticos y eléctricos funcionan como lentes ajustables. El sistema produce un haz muy angosto, que es crítico para un buen microscopio electrónico. El tamaño del haz y la dispersión de electrones limitan el poder de resolución. Afortunadamente, la alta relación carga-masa del electrón permite una dirección relativamente fácil con campos eléctricos y magnéticos; un haz SEM puede converger a una mancha de aproximadamente 5 nanómetros.

Varios efectos importantes ocurren cuando el haz se enfoca en la superficie de la muestra. Primero, algunos de los electrones del haz son reflejados, o retrodispersados, por la muestra. En segundo lugar, los electrones que bombardean provocan que se liberen electrones secundarios de la superficie del material. Estos electrones secundarios han ganado suficiente energía para escapar de los átomos de la muestra. Ambos tipos de emisión de electrones se pueden detectar como una señal y, por lo tanto, se pueden amplificar y registrar. Estas emisiones se usan para formar una imagen de la superficie del espécimen. La intensidad de la señal de retorno causada por electrones secundarios y reflejados depende del ángulo al que el haz golpea las irregularidades en la superficie. El menor número de electrones se emiten desde la superficie cuando el haz impacta directamente en un ángulo de noventa grados, mientras que se producen más emisiones cuando el ángulo es más agudo. Por lo tanto, el SEM crea una imagen de la superficie produciendo una visualización compuesta del número de emisiones que resultan de cada punto que sondea el haz.

Recolectar las emisiones es tecnológicamente crucial. Se utilizan diferentes tipos de detectores para recopilar los diferentes tipos de emisiones, principalmente electrones retrodispersados y electrones secundarios, pero también se producen

otras emisiones, incluidos los fotones y los electrones difractados retrodispersados. Los SEM casi siempre tienen un detector de electrones secundario, y la mayoría también tienen un detector de electrones retrodispersados.

En SEM se mueve un haz muy estrecho de electrones a través de la superficie de una muestra en un patrón de ida y vuelta llamado raster. A medida que el haz de electrones, fino como una aguja, escanea rápidamente sobre la superficie de la muestra, la señal de emisión de cada punto se amplifica y se muestra en un tubo de rayos catódicos, que está sincronizada con la del rayo de exploración. Por lo tanto, las reacciones de cada punto al haz de electrones se registran secuencialmente. La relación seleccionada entre el tamaño del área escaneada y el tamaño del tubo de visualización determina la ampliación de la imagen (Boehlke, 2013).



Figura 4-16. Microscopio electrónico de barrido.

En este estudio, esta técnica es útil ya que permite la visualización de liposomas pequeños con gran aumento y proporciona detalles generales sobre el tamaño y la morfología de las vesículas lipídicas, los cuáles son parámetros importantes que determinan su comportamiento *in vivo*.

Capítulo 5 Equipos y reactivos

Tabla 5-1. Equipos empleados

Equipos	Modelo y marca
Balanza	OHAUS Analytical Plus
Rotavapor	R-3 BUCHI
Sonicador	Cole-Parmer8892
Espectrofotómetro UV-Visible	BioVarian50
Microcalorímetro	MicroCal VP-DSC
Desgasificador	ThermoVac
Centrífuga	HemleLabortchnikGmbH Tipo Z216 MP
Nanosizer	Malvern Instruments ZS ZEN 3600
Extrusor	Lipex
Desionizador	SimplicityMillipore

Tabla 5-2. Reactivos empleados

Reactivos y materiales	Marca	Lote
Filtros y tubos de microcentrífuga	Amicon Ultra-0.5	NA
Alcohol Etílico Absoluto Anhidro 99.90%	Reactivo Baker	9000-02
L- α -PhosphatidycholineDistearoyl (DSPC) 99%	Sigma	120H8368
pinocembrina Estándar Analítico 95%	Sigma-Aldrich	MKCF0471
colesterol 98%	Aldrich	OL217HM
Cloroformo	Sigma-Aldrich	SHBD3579V
resazurina Sal Sódica ~80%	Sigma-Aldrich	MKBZ4934V
Agua destilada y desionizada	Milli-Q	-

Capítulo 6 Metodología

6.1 Sistemas liposomales

A continuación, se describen los sistemas liposomales elaborados en este trabajo. Éstos se realizaron de tal manera que la concentración fue de 10mM. En la Tabla 6-1 se indica la relación molar de cada componente del liposoma, así como las masas de cada uno.

Tabla 6-1. Sistemas liposomales elaborados

Sistema	Componentes	Relación molar con respecto al fosfolípido	Masa (mg)
1	DSPC en diclorometano	1	39.51
2	DSPC en cloroformo	1	39.61
3	DSPC:pinocembrina	4:1	DSPC: 40.16 pinocembrina: 3.31
4	DSPC:colesterol	4:1	DSPC: 39.45 colesterol: 4:48
5	DSPC:colesterol	2:1	DSPC: 39.48 colesterol: 10.00
6	DSPC:colesterol: pinocembrina	4:1:1	DSPC: 39.45 pinocembrina: 3.41 colesterol: 4.54
7	DSPC:colesterol: pinocembrina	2:1:1	DSPC: 39.63 pinocembrina: 3.52 colesterol: 10.03
8	DSPC:resazurina	4:1	DSPC: 39.72 resazurina: 3.07
9	DSPC:resazurina: pinocembrina	8:2:1	DSPC: 39.84 resazurina: 3.31 pinocembrina: 1.77

Se fabricaron liposomas con pinocembrina a diferentes concentraciones, con la finalidad de analizar su comportamiento fisicoquímico. En la Tabla 6-2, se indica la cantidad añadida de pinocembrina y DSPC.

Tabla 6-2. Sistemas liposomales con pinocembrina

Concentración de pinocembrina (mg/mL)	Masa DSPC (mg)	Masa pinocembrina (mg)
0	39.11	-
0.160	39.70	0.8
0.236	39.31	1.18
0.358	39.51	1.79
0.502	39.69	2.51
0.662	40.16	3.31
0.784	39.51	3.92
0.99	39.54	4.97

6.2 Fabricación de liposomas

Las siguientes operaciones y condiciones fueron aplicadas en forma subsecuente en la elaboración de todos los sistemas liposomales:

Preparación de película

1. Disolución de los componentes en 5 mL de cloroformo (CHCl_3).
2. Evaporación del disolvente a sequedad utilizando Rotavapor durante 3 horas a 80°C , 70 rpm.
3. Vacío por 15 minutos.
4. Hidratación de la película con 5 mL de agua destilada.
5. Sonicación con calentamiento por 30 minutos

Extrusión

1. Condiciones:
 - a. Temperatura del baño: 85°C
 - b. Presión de nitrógeno: 100-200 psi
 - c. Número de extrusiones: 25
 - d. Membrana: Policarbonato, poro 100 nm

6.3 Determinación de eficiencia de encapsulación e incorporación

Las siguientes condiciones se aplicaron a sistemas elaborados con pinocembrina y resazurina:

1. Condiciones de centrifugación
 - a. Muestra: 500 μL
 - b. Tiempo: 25 minutos
 - c. Velocidad: 15 000 rpm
2. Lectura de espectrometría
 - a. Barrido: 200-800 nm
 - b. Blanco: etanol/agua

6.4 Análisis fisicoquímico de liposomas

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La muestra y el medio de reacción (agua Milli-Q) son desgasificadas por 15 minutos antes de ser inyectadas en las celdas del instrumento para su análisis térmico.

Para realizar el análisis fisicoquímico mediante DSC es necesario calibrar el equipo con una línea base para eliminar interferencias durante la medición, la cual se estableció utilizando en ambas celdas agua Milli-Q. La línea base se sustrae del perfil térmico de los sistemas liposomales utilizando el Software OriginPro 8.5 Particion. Con este programa se obtuvieron los valores de ΔH , T_m y $T_{1/2}$ de cada experimento.

1. Línea base y muestra
 - a. Condiciones:
 - a. Presión: 35 psi
 - b. Temperatura inicial 25°C
 - c. Temperatura final: 70°C
 - d. Velocidad de scan: 90°C/hora
 - e. Número de escaneos: 3
 - f. Período de filtrado: 10 segundos
 - g. Volumen de celda: 515 μL

6.5 Análisis de estabilidad

Con la finalidad de analizar la estabilidad de los liposomas, se realizaron las siguientes mediciones:

Tamaño de partícula y potencial Z

1. Condiciones:
 - a. Celda medición de potencial Z: DTS1060
Celda medición de tamaño: DTS0012
 - b. Material: lecitina
 - c. Índice de refracción: 1.490 Abs: 0.01

- d. Dispersante: agua
 - e. Temperatura 25°C
 - f. Equilibración: 120 segundos
2. Mediciones:
- a. Potencial Z: automático
 - b. Tamaño: 3 medidas, 10 corridas, 10 segundos

Microscopía electrónica de barrido

1. Condiciones

- a. Dilución en agua de la muestra: 1:200
- b. Recubrimiento: oro
- c. Vacío: alto
- d. Imagen: detector de electrones retrodispersados

6.6 Condiciones de almacenamiento

Posterior a la fabricación de cada sistema liposomal, a lo largo del presente estudio, estos fueron mantenidos en refrigeración a 4°C, ya que estudios refieren que a esta temperatura los liposomas permanecen estables como resultado de una interacción menos probable entre ellos. (Roy et al., 2016)

Capítulo 7 Resultados

7.1 Curvas patrón para la determinación de eficiencia de incorporación y encapsulación

Puesto que resazurina (molécula hidrofílica) y pinocembrina (molécula hidrofóbica) absorben en el espectro UV-VIS es necesario realizar curvas patrón para determinar su concentración en los sistemas liposomales, presentados en capítulos posteriores, los cuales incorporan o encapsulan a tales moléculas.

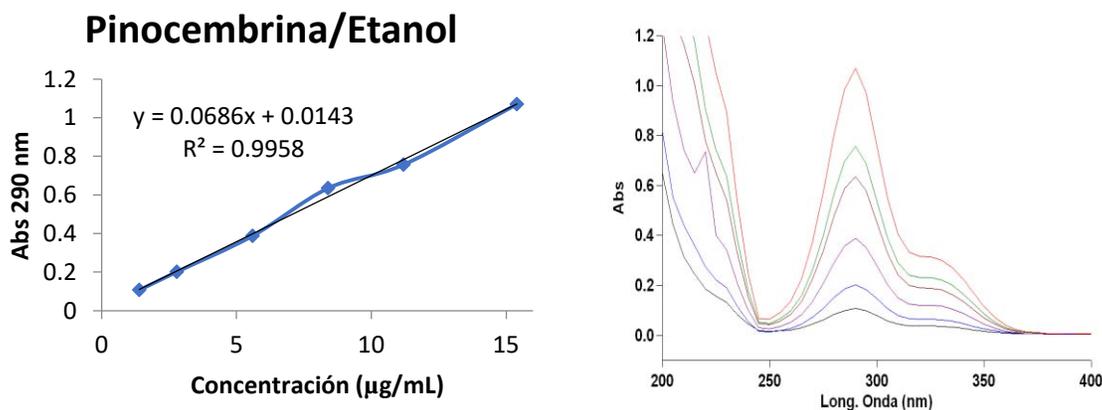
7.1.1 Curva de pinocembrina

Se realizó la curva patrón de pinocembrina utilizando únicamente etanol como disolvente con la finalidad de obtener una ecuación que permita calcular la eficiencia de incorporación de la molécula en la bicapa del liposoma, mediante la lectura de absorbancia a 290 nm en espectrofotometría UV-VIS como lo refiere la literatura (Saavedra et al., 2016). La Gráfica 7-1 muestra el coeficiente de correlación y el barrido obtenido. La ecuación obtenida es:

Ecuación 7-1

$$Abs_{290\text{ nm}} = 0.0686 \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) + 0.0143$$

Gráfica 7-1. Curva patrón de pinocembrina en etanol (derecha) y espectro (izquierda)



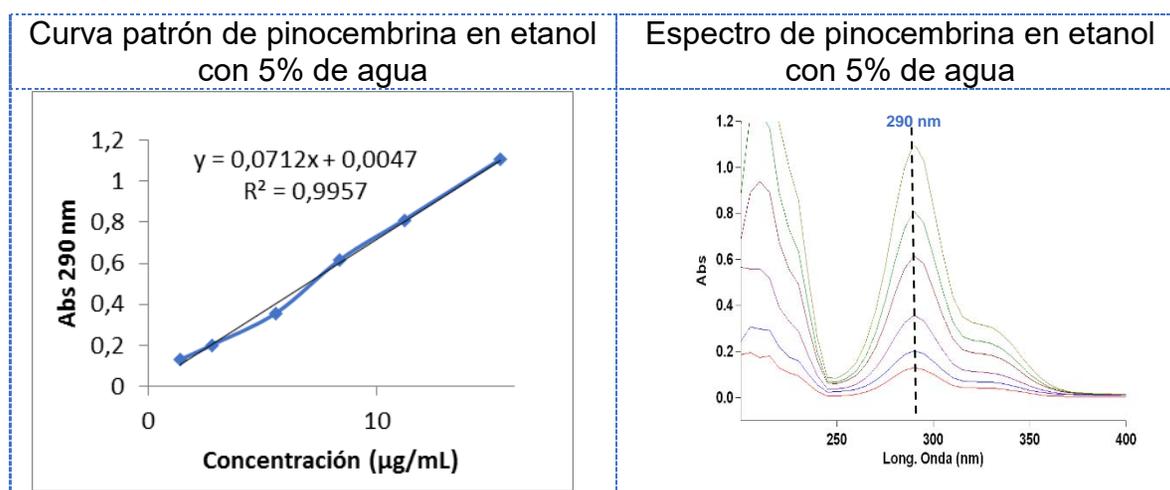
Con la finalidad de demostrar que la absorbancia de las muestras con pinocembrina no se ve afectada por la cantidad de agua contenida, ya que los liposomas fueron elaborados en agua, se realizaron curvas con diferentes porcentajes de ésta. En la Tabla 7-1 se muestran los resultados.

Tabla 7-1. Curva patrón de absorbancia (290 nm) de pinocembrina en etanol con diferentes proporciones de agua

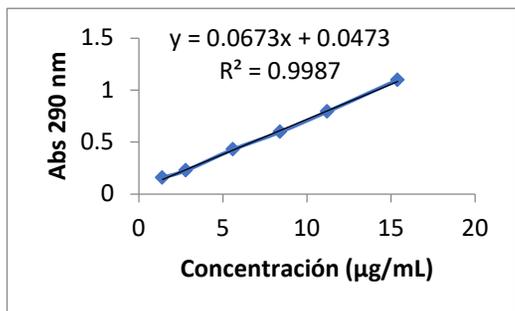
Conc. (µg/mL)	Sin agua	Agua 5%	Agua 10%	Agua 15%	Agua 20%	Agua 25%	Promedio	% CV
1.4	0.107	0.130	0.157	0.134	0.140	0.150	0.134 ± 0.018	13.54
2.8	0.202	0.202	0.227	0.194	0.238	0.239	0.213 ± 0.019	8.87
5.6	0.388	0.357	0.428	0.394	0.444	0.484	0.402 ± 0.034	8.55
8.4	0.635	0.617	0.597	0.627	0.644	0.686	0.624 ± 0.018	2.90
11.2	0.757	0.810	0.792	0.786	0.787	0.810	0.786 ± 0.019	2.42
15.4	1.070	1.104	1.097	1.134	1.093	1.105	1.100 ± 0.023	2.10

Utilizando las mismas concentraciones de pinocembrina y aumentando el porcentaje de agua añadido (5-25%), en las curvas de la Figura 7-1 se observa la longitud de onda de absorbancia máxima (Columna derecha) no cambia y el coeficiente de correlación muestra que los datos obtenidos siguen ajustándose a una ecuación de la recta de primer grado (Columna izquierda).

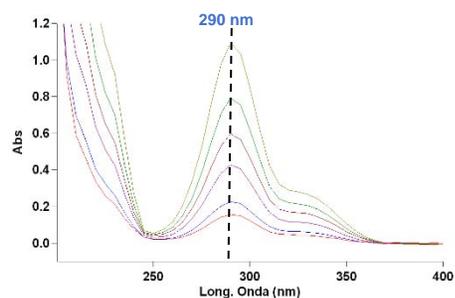
Figura 7-1 Gráficas de curvas patrón con proporción 5-25% de agua y espectro correspondiente.



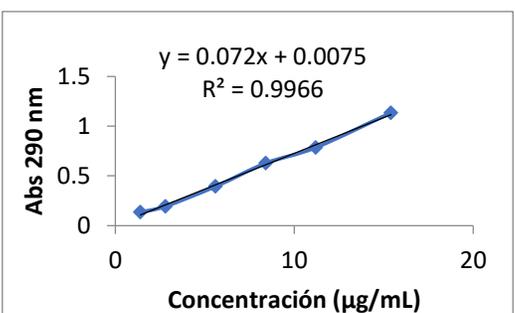
Curva patrón de pinocembrina en etanol con 10% de agua



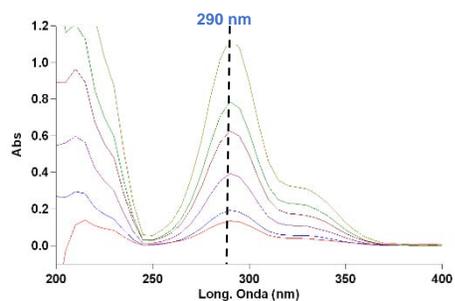
Espectro de pinocembrina en etanol con 10% de agua



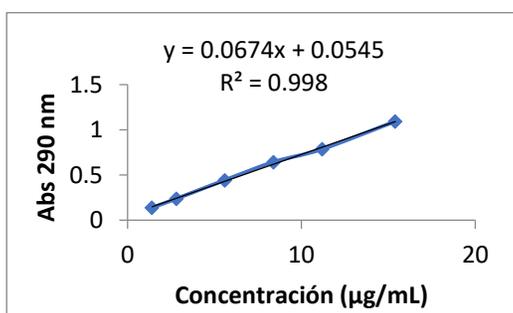
Curva patrón de pinocembrina en etanol con 15% de agua



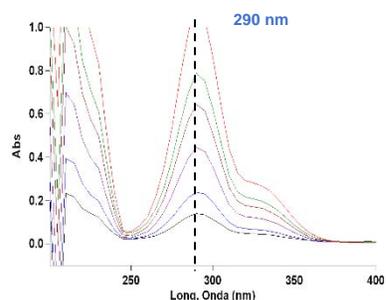
Espectro de pinocembrina en etanol con 15% de agua



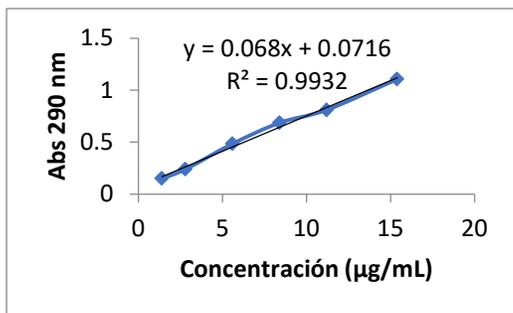
Curva patrón de pinocembrina en etanol con 20% de agua



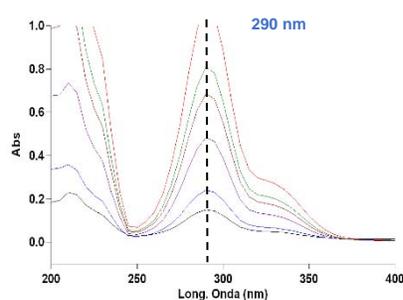
Espectro de pinocembrina en etanol con 20% de agua



Curva patrón de pinocembrina en etanol con 25% de agua

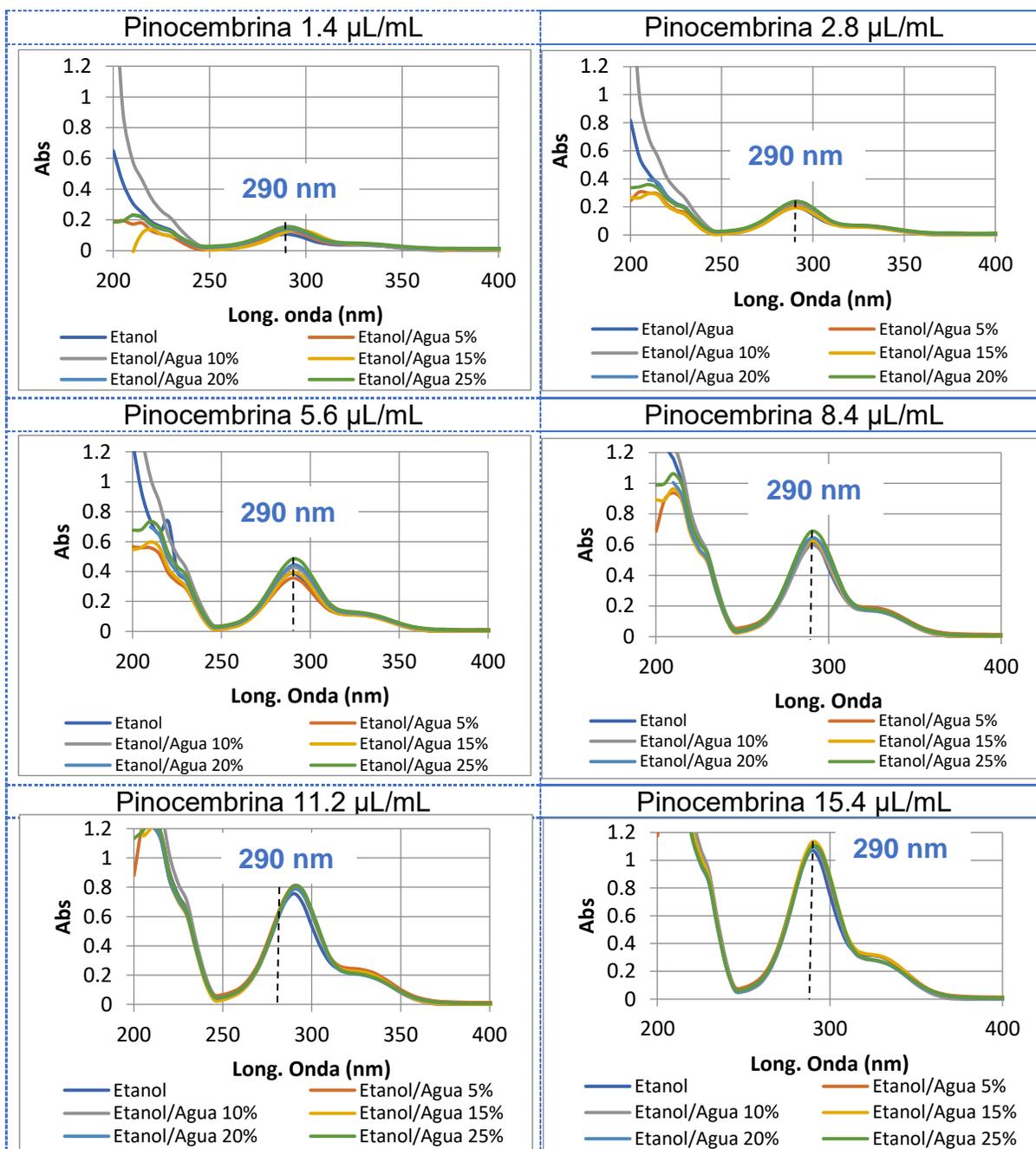


Espectro de pinocembrina en etanol con 25% de agua



En la Figura 7-2, las gráficas mostradas sobrepone los barridos obtenidos con las proporciones del 5-25% de agua para cada concentración de pinocembrina mostrada en las curvas anteriores, para hacer más ilustrativo que el pico de absorción a 290 nm de la pinocembrina no se recorre a valores menores ni mayores de longitud de onda.

Figura 7-2 Barrido de adsorción en función de longitud de onda con diferentes porcentajes de agua y determinada concentración de pinocembrina



Con este experimento se demuestra que el componente agua, incluido en los sistemas liposomales, no modifica el comportamiento de pinocembrina en las lecturas espectrofotométricas UV-VIS, por lo tanto, es posible realizar las lecturas de absorbancia incluyendo diferentes proporciones etanol/agua.

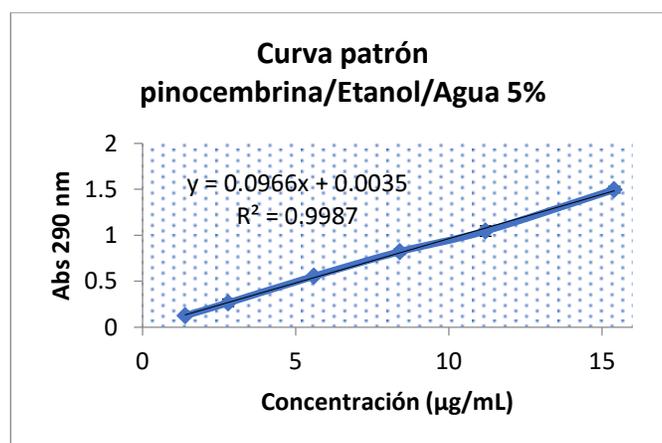
Con el fin de utilizar aquella curva que incluya a los 2 disolventes, se eligió la curva patrón agua/etanol al 5% para determinar la concentración de pinocembrina en los liposomas elaborados. El porcentaje de agua fue escogido debido a que las alícuotas que presentan una señal cuantificable en las mediciones de absorbancia contenían una cantidad de agua menor al 5%.

La Tabla 7-2 y la Gráfica 7-2 muestran los resultados obtenidos de la curva patrón elegida (5% agua) realizada por triplicado.

Tabla 7-2. Curva patrón pinocembrina/etanol/agua 5%

Concentración (µg/mL)	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃	Promedio
1.4	0.119	0.13	0.128	0.126 ± 0.006
2.8	0.251	0.231	0.312	0.265 ± 0.042
5.6	0.562	0.555	0.545	0.554 ± 0.009
8.4	0.788	0.841	0.836	0.822 ± 0.029
11.2	1.098	0.985	1.054	1.046 ± 0.057
15.4	1.463	1.492	1.534	1.496 ± 0.036

Gráfica 7-2. Curva patrón pinocembrina/etanol/agua 5%



La ecuación que se utilizó para mediciones posteriores para aquellos liposomas con pinocembrina es:

Ecuación 7-2 $Abs_{290\text{ nm}} = 0.0966 \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) + 0.0035$

7.1.2 Curva de resazurina

Se realizaron por triplicado curvas patrón de resazurina para obtener el porcentaje de encapsulación de cada muestra en el centro acuoso del liposoma, mediante la lectura de absorbancia a 610 nm, con el Espectrofotómetro UV-VIS, según lo reportado en la literatura (Zrimšek, Kunc, Kosec, & Mrkun, 2004).

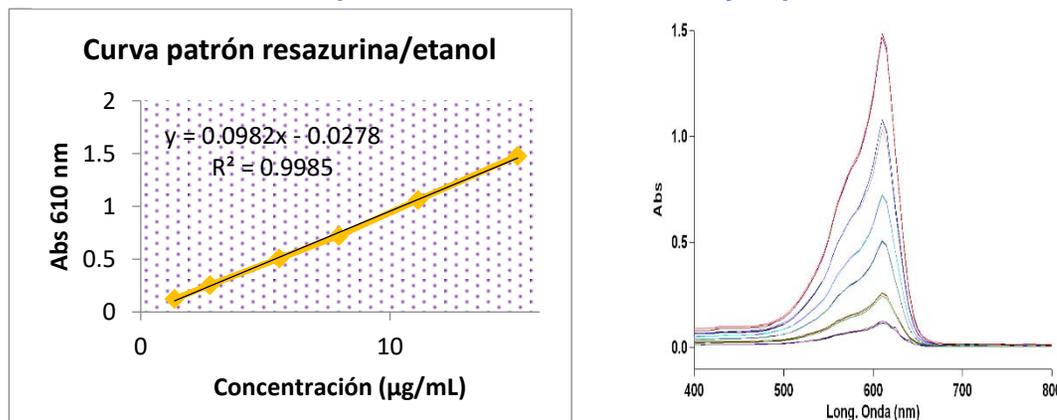
En la Tabla 7-3 se muestran las concentraciones utilizadas para la elaboración de las curvas en etanol. De esta tabla se obtiene la Gráfica 7-3 que muestra la linealidad y el espectro de absorción, además se obtiene la Ecuación 7-3, con la que se realizaron los cálculos pertinentes.

Ecuación 7-3 $Abs_{610\text{ nm}} = 0.0982 \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) - 0.0278$

Tabla 7-3. Curva patrón de resazurina

Concentración (µg/mL)	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃	Promedio
1.36	0.119	0.126	0.126	0.120 ± 0.004
2.78	0.257	0.245	0.260	0.254 ± 0.008
5.56	0.505	0.503	0.510	0.506 ± 0.004
7.95	0.726	0.722	0.715	0.721 ± 0.006
11.13	1.029	1.076	1.077	1.061 ± 0.027
15.12	1.463	1.485	1.483	1.477 ± 0.012

Gráfica 7-3. Curva patrón de resazurina/etanol y espectro de absorción



Como se demostró en la sección anterior, el pico de máxima absorción ni las ecuaciones (Figura 7-1) se ven afectadas por la presencia de agua; sin embargo, lo anterior se verifica al realizar la curva patrón de resazurina incluyendo 5% de agua. Los datos obtenidos, la curva y espectro se visualizan en la Tabla y Gráfica 7-4.

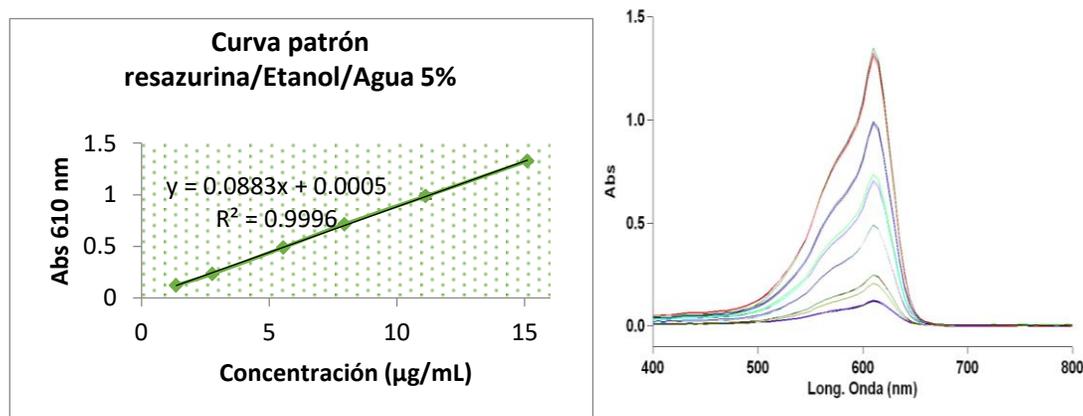
La ecuación propuesta que se utilizó para determinar la concentración en experimentos posteriores que incluyan resazurina será:

Ecuación 7-4 $Abs(610\text{ nm}) = 0.0883 \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) + 0.0005$

Tabla 7-4. Curva patrón de resazurina/etanol/agua 5%

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃	Promedio
1.36	0.120	0.127	0.125	0.124 \pm 0.004
2.78	0.207	0.248	0.248	0.234 \pm 0.024
5.56	0.489	0.490	0.492	0.490 \pm 0.002
7.95	0.737	0.700	0.709	0.715 \pm 0.019
11.13	0.982	0.994	0.984	0.987 \pm 0.006
15.10	1.324	1.348	1.308	1.327 \pm 0.020

Gráfica 7-4. Curva patrón de resazurina/etanol/agua 5%



En la siguiente sección se presentan los resultados de cada sistema liposomal elaborado.

7.2 DSPC en diclorometano (CH₂Cl₂)

Es importante mencionar que esta elaborar el liposoma, el lípido presentó problemas de insolubilidad con el disolvente seleccionado (diclorometano), se observaron partículas suspendidas y no se obtuvo una película fina y uniforme.

7.2.1 Calorimetría diferencial de barrido

Se realizaron tres escaneos DSC para el sistema de DSPC en CH₂Cl₂. Distinga en la Gráfica 7-5 que al traslapar los escaneos, el perfil térmico es idéntico, siendo indicativo de que el proceso es reversible. Se distingue la pre-transición aproximadamente 10° C debajo de la transición principal. Se muestra un pico único muy angosto, correspondiente a la transición principal con valor promedio de T_m de 53.70°C y T_{1/2} cercano a 1, lo que significa que el sistema se encuentra puro (Ver Gráfica y Tabla 7-5). La temperatura de transición así como la entalpía, no difiere de lo reportado en la literatura (~53.7°C) (Kneidl, Peller, Winter, Lindner, & Hossann, 2014) y son comparables con otros experimentos realizados por investigadores del mismo laboratorio (Felipe, 2017).

Gráfica 7-5. DSC escaneos sobrelapados de DSPC 10 mM en diclorometano

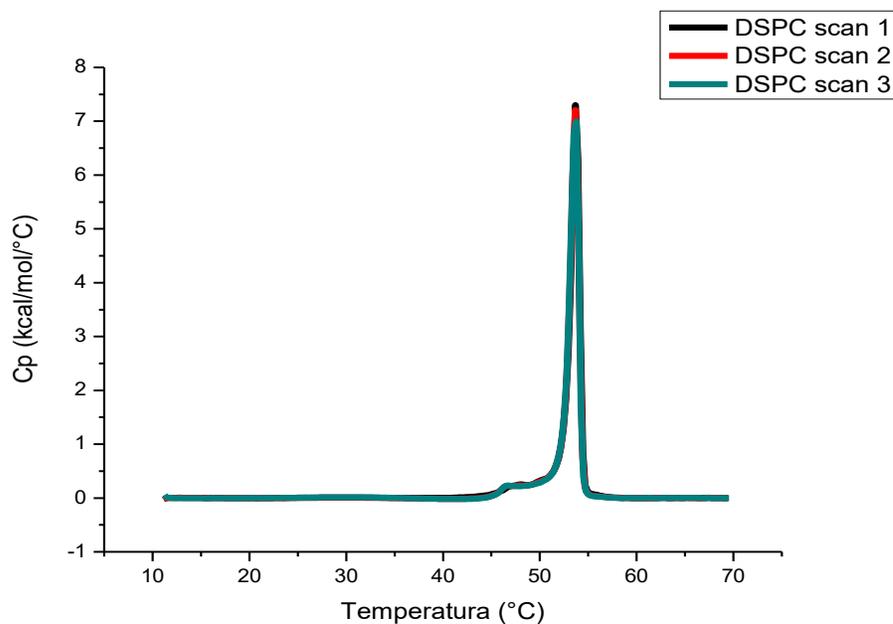


Tabla 7-5. Parámetros fisicoquímicos obtenidos para DSPC en CH₂Cl₂

Escaneos	ΔH (kcal/mol)	T _m (°C)	T _{1/2} (°C)
1	9.20	53.7	1.0
2	8.99	53.7	1.0
3	9.11	53.7	1.0
Promedio	9.10 ± 0.10	53.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0

7.2.2 Tamaño y potencial Z

De acuerdo a los resultados por DLS, la muestra es polidispersa (Tabla 7-6); se encontraron poblaciones del orden de nanómetros y de micras. Se observó que al día posterior de la obtención de liposomas, éstos formaron agregados visibles (Figura 7-3). El valor de potencial Z, indicador de la estabilidad, es alrededor de 2 mV (Tabla 7-7).

Tabla 7-6. Tamaño DSPC en diclorometano

Población	Tamaño (nm)	Intensidad (%)
1	2547 ± 2160	38.1
2	89.19 ± 13.44	24.8
3	3747 ± 2472	22.3
PDI	1	

Figura 7-3. Precipitado de liposomas al día siguiente de su elaboración

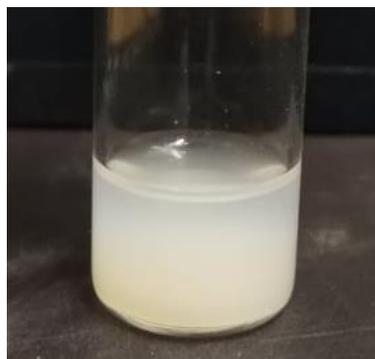


Tabla 7-7. Potencial Z DSPC en diclorometano

Medición	Potencial Z (mV)
1	2.10
2	2.21
3	1.80
4	2.11
5	2.03
6	2.33
Promedio	2.10 ± 0.08

7.3 DSPC en cloroformo (CHCl₃)

Debido a la poca estabilidad en disolución obtenida en el sistema y a los problemas de insolubilidad presentados por DSPC en diclorometano, se decidió cambiar el disolvente por cloroformo.

En este caso, otra variable modificada fue el número de veces en que la muestra se sometió a extrusión, en el sistema anterior fueron 15 veces, mientras que este experimento fueron 25. Se pretende con estas modificaciones, obtener mayor estabilidad en el sistema.

7.3.1 Calorimetría diferencial de barrido

Observe en la Gráfica 7-6 que de igual manera se obtiene un patrón idéntico en los tres escaneos, no obstante, el pico de transición principal tiende a ensancharse más que con el experimento anterior (Ver DSPC en CH₂Cl₂) y la pre transición no se distingue tan claramente. Sin embargo, el valor de entalpía y T_m (53.70 °C) es similar, demostrándose con este experimento que el disolvente empleado no cambia el perfil fisicoquímico obtenido con la técnica DSC.

Gráfica 7-6 DSC escaneos sobrelapados de DSPC 10 mM en cloroformo

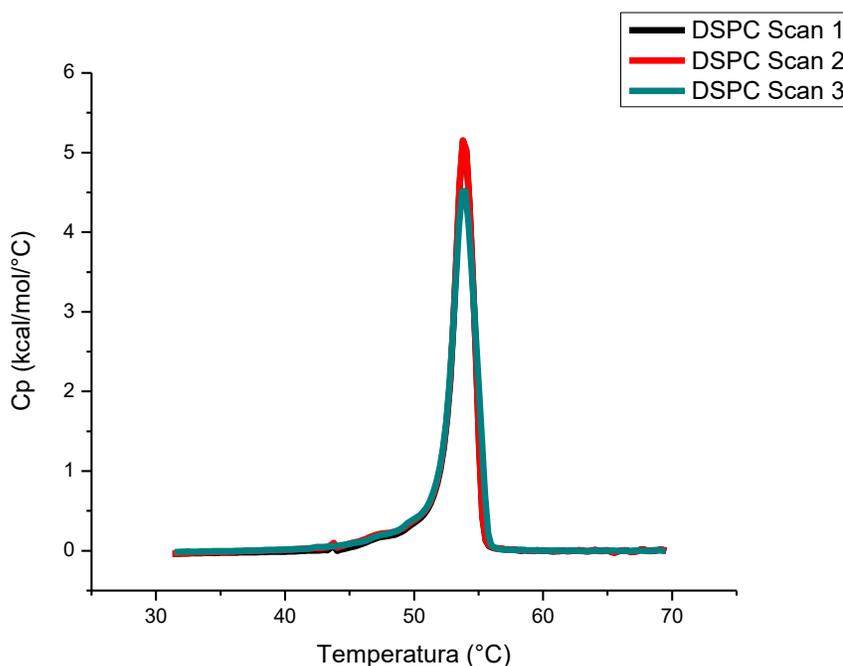


Tabla 7-8. Parámetros fisicoquímicos de DSPC en cloroformo

Escaneos	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
1	10.79	53.8	1.8
2	10.28	53.8	2.0
3	10.88	53.9	1.9
Promedio	10.65 ± 0.33	53.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1

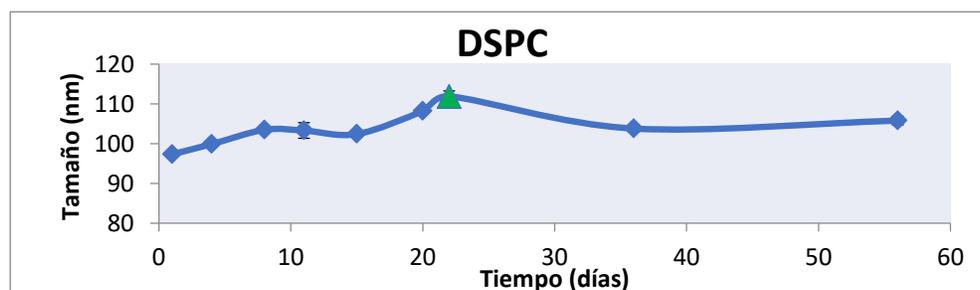
7.3.2 Tamaño y potencial Z

El tamaño inicial de los liposomas es de aproximadamente 100 nm, observándose una única población de este tamaño hasta el día 15 (Tabla 7-9). Observe que el diámetro del liposoma aumenta conforme avanza el tiempo. Se simboliza en la Gráfica 7-7 y en la Tabla 7-9 con un triángulo verde, el momento en que aparece una segunda población del orden de micrómetros. Sin embargo, es hasta el día 22 que se observa un precipitado, por ello la técnica de DLS indica la probable formación de agregados visibles en la segunda población.

Tabla 7-9. Tamaño de partícula de DSPC en cloroformo obtenido por DLS

Día	Tamaño (nm)	Intensidad (%)	PDI
1	97.34 ± 0.42	100	0.077 ± 0.011
4	99.88 ± 0.45	100	0.094 ± 0.008
8	103.5 ± 0.35	100	0.124 ± 0.018
11	103.3 ± 1.96	100	0.108 ± 0.006
15	102.4 ± 0.36 4445	97.2 2.8	0.166 ± 0.023
20	108.2 ± 0.60 4805	97.3 2.7	0.161 ± 0.020
$\Delta 22$	111.9 ± 1.40	100	0.186 ± 0.010
36	103.8 ± 0.85	100	0.089 ± 0.003
56	105.8 ± 1.041	100	0.110 ± 0.036

Gráfica 7-7. Tamaño de DSPC en cloroformo en función del tiempo



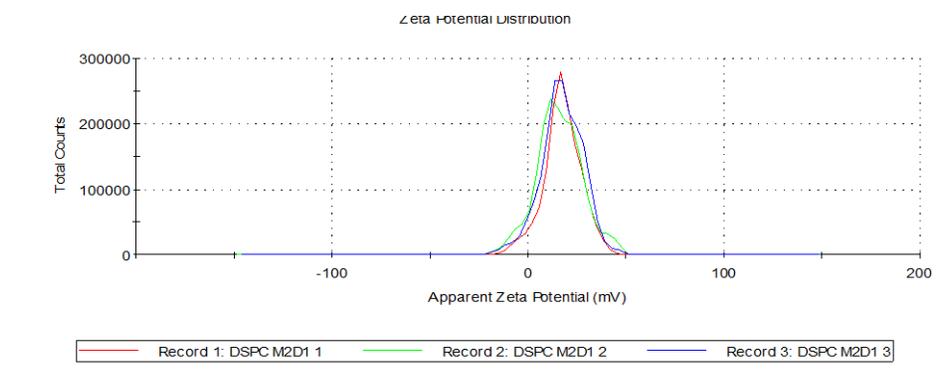
La principal ventaja biológica de los liposomas pequeños (70-200 nm) es que al aplicarse por inyección intravenosa, son removidos menos rápidamente del flujo sanguíneo, obteniéndose una circulación prolongada para llevar a cabo su efecto terapéutico (Torchilin, 2003).

El valor de potencial Z (Tabla 7-10) aumenta con 8 veces respecto al sistema anterior (Ver DSPC en CH₂Cl₂), concordando con los resultados de tamaño de partícula y con las observaciones macroscópicas, es decir, el sistema DSPC es más estable en disolución, habiendo modificado pasos críticos en la elaboración de los liposomas.

Tabla 7-10. Potencial Z de DSPC en cloroformo

Medición	Potencial Z (mV)
1	17.2
2	16.0
3	17.2
Promedio	16.8 ± 0.693

Figura 7-4. Potencial Z de DSPC en cloroformo

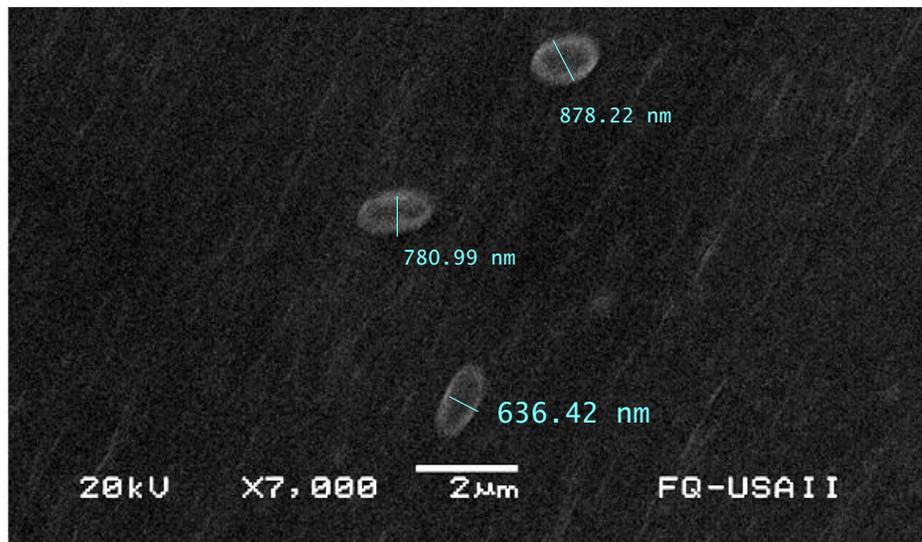


7.3.3 Morfología

En la Figura 7-5 se muestra una micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM), en ésta se aprecia la morfología de los liposomas: unilaminar, ligeramente alargada, de tamaño en nanómetros (nm).

La importancia de que haber obtenido liposomas unilaminares es que de esta manera se mejora su estabilidad física en términos de sedimentación o floculación y se mejora la eficiencia de incorporación (Torchilin, 2003).

Figura 7-5. Imagen de liposomas de DSPC en cloroformo obtenida por SEM



7.4 DSPC:colesterol

Puesto que se demostró que los sistemas mostraron mayor estabilidad utilizando cloroformo en su elaboración, los siguientes liposomas se fabricaron con tal disolvente.

7.4.1 Calorimetría diferencial de barrido

En este sistema se añadió colesterol al liposoma en relación molar 4:1 y 2:1. Al comparar ambas relaciones molar (Gráfica 7-8), en el perfil térmico se observa que el pico se abate radicalmente con ambas relaciones molares, el pico se ensancha considerablemente por la presencia de otro componente; sin embargo, era de esperarse que el valor de $T_{1/2}$ fuera mayor en el sistema que contiene más colesterol como lo refieren otros investigadores (McMullen, Lewis, & McElhaney, 1993).

En la Tabla 7-11 se muestran los parámetros fisicoquímicos de cada sistema de colesterol. En ambos casos, la entalpía disminuye si se compara con la entalpía del fosfolípido puro, por lo tanto, este parámetro indica que entre mayor sea la cantidad añadida de colesterol, más débiles son las interacciones entre los fosfolípidos de la bicapa.

El valor de T_m desplazado hacia la izquierda muestra que el colesterol fluidiza la bicapa, indistintamente de la cantidad añadida.

Gráfica 7-8. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:colesterol 4:1 y 2:1

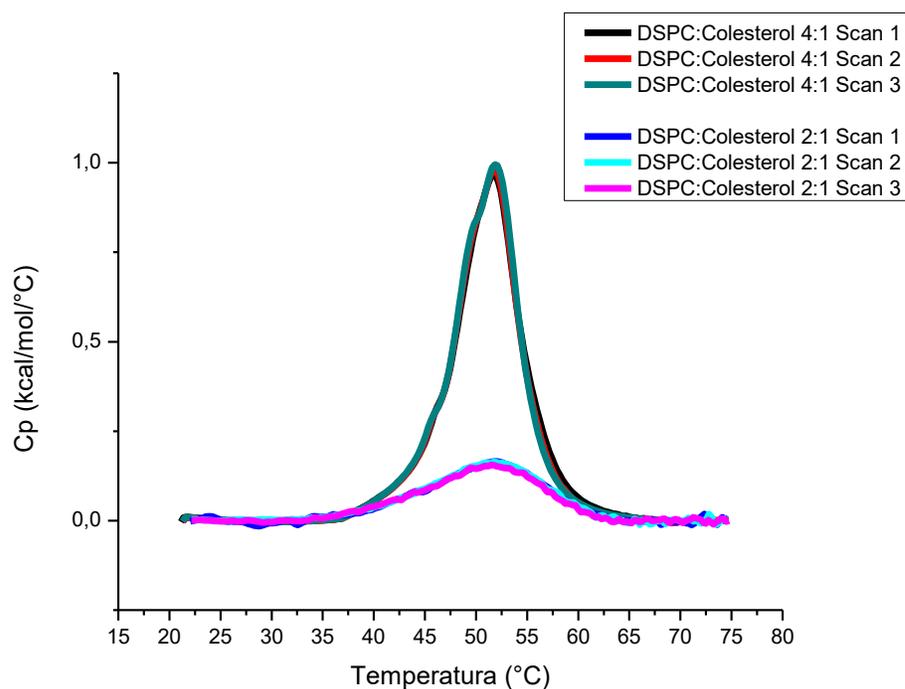


Tabla 7-11. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:colesterol

Escaneos	Relación molar 4:1			Relación molar 2:1		
	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	ΔH (cal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
1	8.01	51.7	6.8	2.27	52.1	12.3
2	7.96	51.9	6.8	2.26	51.8	13.3
3	7.99	51.8	6.8	2.16	51.5	13.5
Promedio	7.99 ± 0.03	51.8 ± 0.1	6.8 ± 0.0	2.23 ± 0.06	51.8 ± 0.3	13.0 ± 0.7

7.4.2 Tamaño de partícula

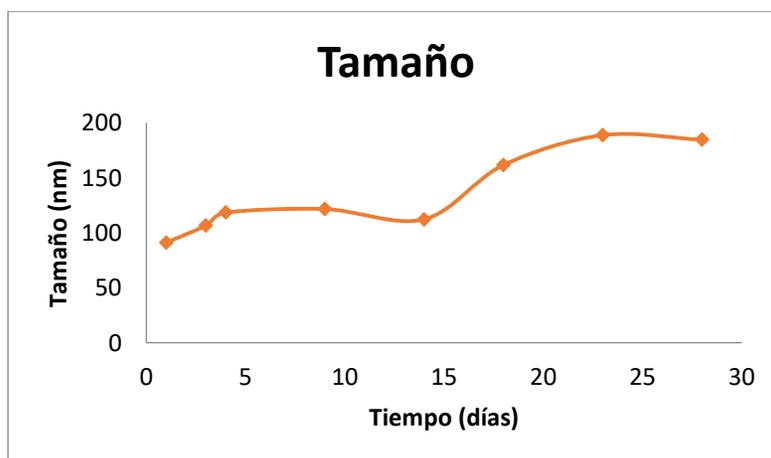
La Tabla 7-12 resume los tamaños de partícula obtenidos por DLS. Puesto que desde el primer día el equipo detecta dos poblaciones, en cada columna se indica el tamaño y la intensidad de cada una. Los tamaños obtenidos son alrededor de 100 nm hasta el día 4 donde se encuentra una población de micrómetros y el valor del índice de polidispersidad indica que existen poblaciones de tamaños parecidos entre sí.

En la Gráfica 7-9 se observa una tendencia en el aumento de tamaño, sin embargo hasta después del día 28 no se observan agregados, indicando una alta estabilidad del sistema.

Tabla 7-12. Tamaño de liposomas de DSPC:colesterol a través del tiempo

Día	Tamaño (nm)		Intensidad (%)		Índice de polidispersidad
	1	2	1	2	
1	91.1 ± 9.6	109.8 ±190.1	93.7 ± 11.6	6.7 ±11.6	0.207 ± 0.018
3	106.6 ± 30.6	88.8 ±106.3	74.2 ±22.3	25.8 ±22.6	0.235 ± 0.007
4	118.4 ±7.8	1249 ±2130	94.7 ± 5.8	5.3 ±5.8	0.237 ± 0.015
9	121.6 ± 39.4	145.1 ±166	74.9 ± 11.5	24.3 ±12	0.274 ± 0.019
14	112.3 ± 3.0	248.7 ±156.1	54.8 ± 1.8	45.2 ±1.8	0.344 ± 0.014
18	161.6 ± 43.2	3469 ±2945	85.3 ± 20.7	14.7 ±20.7	0.313 ± 0.017
23	188.7 ± 77.7	477.6 ±712.3	70.8 ± 17.1	29.2 ±17.1	0.334 ± 0.025
28	184.6 ± 86.2	147.2 ±130.2	56.9 ± 5.4	43.1 ±5.4	0.358 ±0.059

Gráfica 7-9. Tamaño de DSPC:colesterol en función del tiempo



7.4.3 Morfología

La morfología del liposoma es alargada, y los resultados de tamaño lo ubican dentro del orden de nanómetros.

Figura 7-6. SEM de DSPC:colesterol



7.5 DSPC:pinocembrina

7.5.1 Calorimetría diferencial de barrido

En este sistema se incluye a la molécula de carácter hidrofóbico: pinocembrina, en relación molar 4:1 con respecto al lípido. En la Gráfica 7-10 pueden distinguirse 2 picos, posiblemente a la presencia de dominios dentro de la bicapa (Wu et al., 2012).

El valor de $T_{1/2}$ (Tabla 7-13) aumenta y esto es de esperarse, ya que el sistema está conformado por dos componentes; el lípido y la pinocembrina, comprobándose que esta molécula efectivamente se incorpora en la bicapa. Por otro lado y contrariamente al sistema DSPC:colesterol, el valor de T_m es desplazado hacia la derecha, indicando gelificación de la bicapa.

Observe que debido a la presencia de pinocembrina los escaneos obtenidos no son idénticos, indicando que posiblemente exista un reacomodo molecular de la bicapa al aplicarse calor.

Gráfica 7-10. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:pinocembrina 4:1

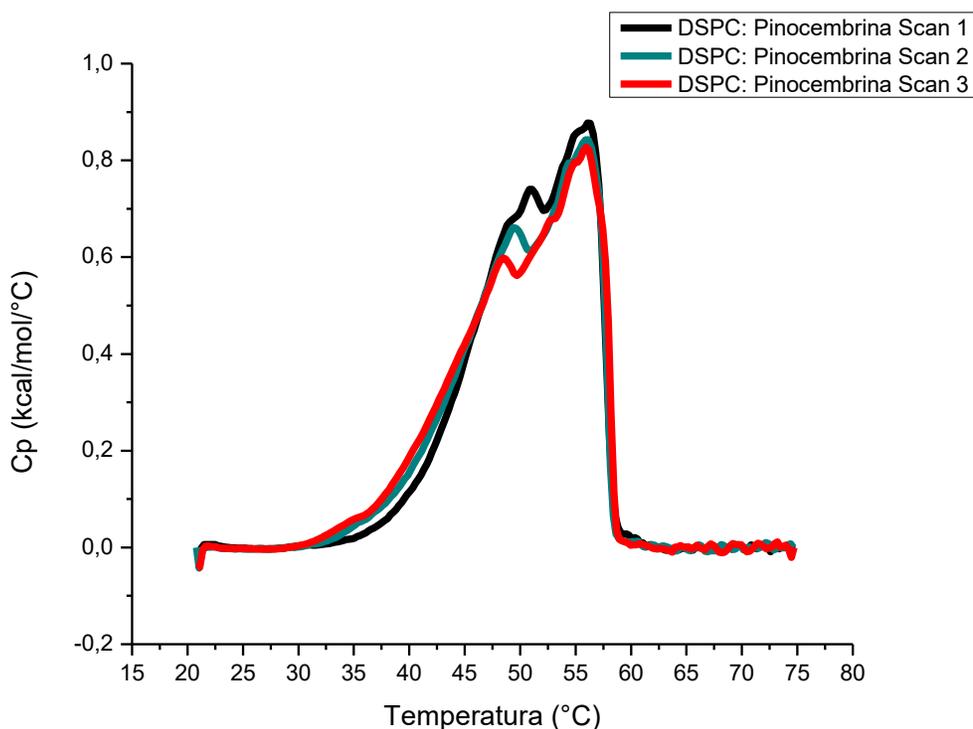


Tabla 7-13. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:pinocembrina 4:1

Escaneos	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
1	10.23	56.1	12.0
2	10.27	55.9	12.5
3	10.31	55.9	13.3
Promedio	10.27 ± 0.04	55.9 ± 0.1	12.6 ± 0.6

La presencia de 2 picos indica que los datos obtenidos por medio DSC, deben tratarse de diferente manera que los sistemas anteriores, por lo que se analizará la traza calorimétrica por otro método para obtener los parámetros fisicoquímicos correspondientes a cada pico.

A cada uno de los escaneos de DSPC:pinocembrina 4:1 obtenidos por DSC se les aplicó deconvolución, el tratamiento de datos con el que se pretende obtener información sobre todas las transiciones individuales que constituyen el proceso general de transición de fase, utilizando Origin Pro 8.5 Particion. Básicamente, con

éste método es posible obtener los datos termodinámicos para cada estado de transición de una transición completa (Spink, 2015).

En la Gráfica 7-11 observe que al realizar la deconvolución, cada pico se analiza de manera independiente utilizando el software mencionado. La Tabla 7-14 muestra los parámetros obtenidos. Se designa como pico 1 al que se observa del lado izquierdo y como pico 2 al del lado derecho de la gráfica.

Gráfica 7-11. Deconvolución de picos DSPC:pinocembrina 4:1

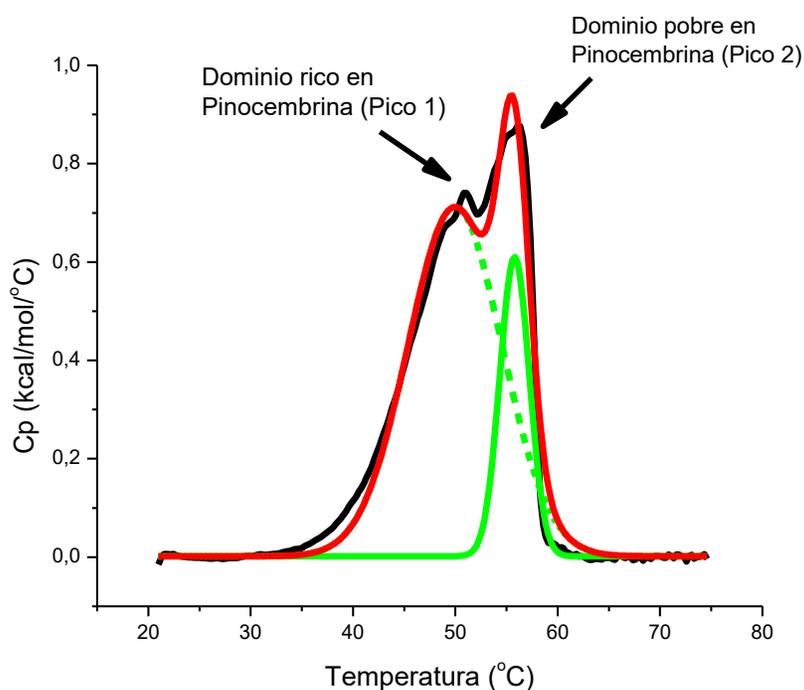


Tabla 7-14. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:pinocembrina 4:1 obtenidos por DSC utilizando deconvolución de picos

Escaneos	ΔH_1 (kcal/mol)	ΔH_2 (kcal/mol)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	$T_{1/2} 1$ (°C)	$T_{1/2} 2$ (°C)
1	8.14	2.19	49.9	55.8	9.2	2.9
2	7.90	2.43	49.2	55.7	9.9	3.2
3	7.89	2.68	48.8	55.6	10.7	3.5
Promedio	7.98 ± 0.14	2.43 ± 0.24	49.3 ± 0.6	55.7 ± 0.1	9.9 ± 0.8	3.2 ± 0.3

Los resultados obtenidos muestran que posiblemente existan dominios ricos y pobres en pinocembrina en la bicapa, probablemente, el pico 1 sea el dominio rico en pinocembrina y el pico 2 el dominio pobre en pinocembrina. Las razones de este argumento se basan en lo siguiente:

El pico 1 visualmente es corto y ancho, tiene un valor mayor de $T_{1/2}$ (indicador de pureza) si se compara con el otro pico. Con este resultado se infiere que existe mayor presencia de moléculas de pinocembrina en esa región de la bicapa. Se refleja que entre mayor cantidad de moléculas de pinocembrina se encuentren, la bicapa se fluidiza al recorrer el valor de T_m a la izquierda. No obstante, el valor de entalpía es mayor para este pico (dominio rico en pinocembrina), esto se debe a que se requiere mayor energía para romper las interacciones que se forman entre las moléculas de pinocembrina con los fosfolípidos.

Por otro lado, el pico 2 es un pico más alto y más angosto, el cual tiene un ancho de $T_{1/2}$ de 3.5 °C, menor al pico al 1 (cercano a 11 °C). Se infiere que existe menor presencia de moléculas de pinocembrina en dicha región del liposoma, es decir, es un dominio pobre. El valor de T_m concuerda a lo mencionado anteriormente, pues es un valor más cercano al que se obtiene con el fosfolípido puro. Sin embargo, la entalpía es menor indicando que existe una disminución de las fuerzas de Van der Waals que existen entre los fosfolípidos ocasionada por la intercalación de pinocembrina.

7.5.2 Tamaño y potencial Z

La Tabla 7-15 muestra el tamaño de partícula obtenido al transcurrir el tiempo. Al día uno, los liposomas tienen una población monodispersa (Figura 7-7) alrededor de 100 nm.

Figura 7-7. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina 4:1 al día 1

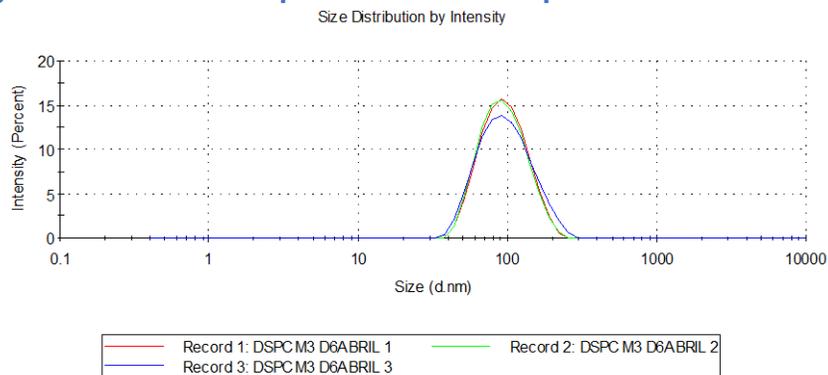
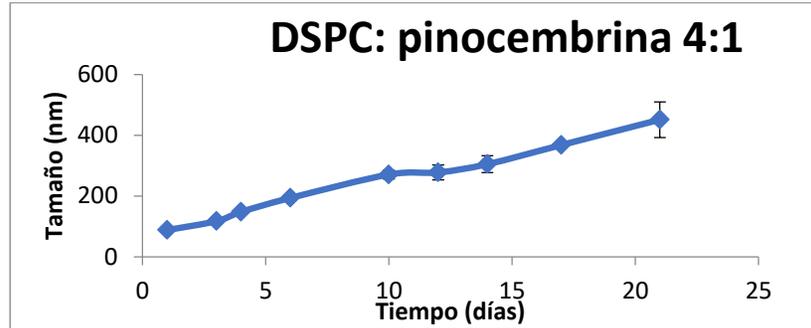


Tabla 7-15. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina 4:1

Día/ Poblaciones	Tamaño (nm)			Intensidad (%)			Índice de polidispersidad
	1	2	3	1	2	3	
1	88.17 ± 0.61	-	-	100	-	-	0.119 ± 0.015
3	117.5 ± 1.32	3227 ±14326	-	84.9	15.1	-	0.279 ± 0.019
4	147.9 ± 1.10	3597 ± 584.4	-	96.2	7.4	-	0.318 ± 0.008
6	193.8 ± 2.23	1589 ± 337.7	-	59.7	40.3	-	0.458 ± 0.017
10	271 ± 14.30	753.2 ± 43.85	5185 ± 78.01	67.1	21.3	11.6	0.630 ± 0.047
12↓	278 ± 24.39	1971± 2805	3639 ± 3153	72.0	24.4	3.7	0.607 ± 0.052
14	305.2 ± 27.48	573.1 ± 342.3	1805 ± 3127	73.4	24.5	17.2	0.620 ± 0.022
17	368.2 ± 9.302	205.9 ± 231.4	-	79.1	20.9	-	0.636 ± 0.014
21	451.7 ± 58.56	31.87 ± 27.63	-	95.4	4.6	-	0.567 ± 0.035

Observe en la Gráfica 7-12 que el tamaño de la población 1 aumenta proporcionalmente al número de días transcurridos desde su elaboración. Al tercer día, aparece una proporción considerable de una población del orden de micrómetros (Población 2). Entre el día 10 y 14 aparece una tercera población. La Gráfica muestra una tendencia clara de los liposomas a agregarse, entre más días transcurran, los liposomas se agregan cada vez más hasta un punto en el que se forman poblaciones de tamaño mucho mayor.

Gráfica 7-12. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina 4:1

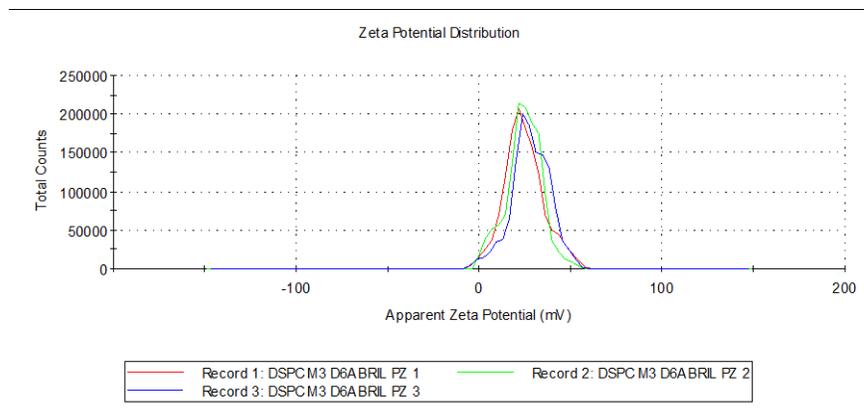


La Tabla 7-16 indica los valores de potencial Z obtenidos del sistema DSPC:pinocembrina 4:1 al día 1 de elaboración (Figura 7-8). Percátense que este valor es el mayor obtenido de todos los sistemas elaborados, siendo indicativo que la estabilidad es mayor en disolución comparado con los otros sistemas que contienen algún otro aditivo. Posteriormente, se comprobará que en liposomas con pinocembrina, no es conveniente usar colesterol.

Tabla 7-16. Potencial Z de DSPC:pinocembrina 4:1 Día 1

Mediciones	Potencial Z (mV)
1	24.7
2	24.8
3	28.4
Promedio	26.0 ± 2.11

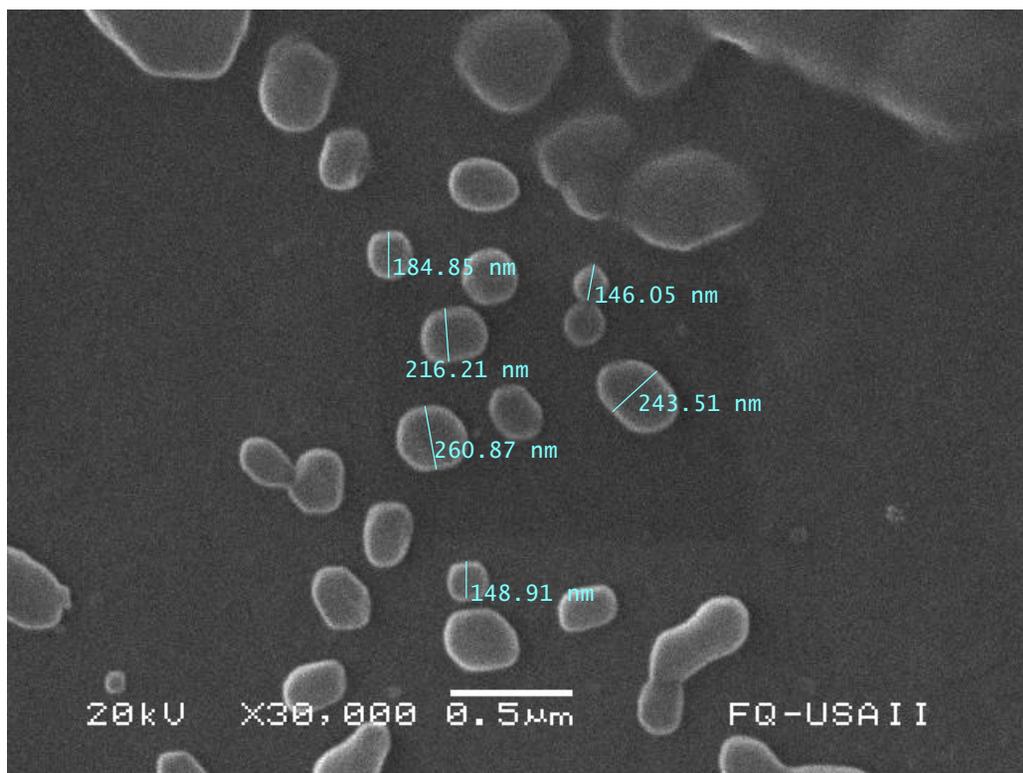
Figura 7-8. Potencial Z de DSPC:pinocembrina 4:1 Día 1



7.5.3 Morfología

La Figura 7-9 muestra que la morfología de los liposomas DSPC:pinocembrina es ligeramente alargada; además, se observa de morfología irregular, unos pocos. El tamaño concuerda con los resultados obtenidos por medio de DLS ya que también se observan algunas partículas de mayor tamaño e incluso algunos agregados.

Figura 7-9. Imagen obtenida por SEM de DSPC:pinocembrina 4:1



7.5.4 Eficiencia de incorporación

Como se mencionó en el apartado 4.5.1, se le nombrará como eficiencia de incorporación a la tendencia de la pinocembrina a incorporarse dentro de la bicapa del lípido DSPC. Para obtener este parámetro, 500 μ L de muestra son centrifugados utilizando los dispositivos Amicon® y se lee la absorbancia a 290 nm del filtrado (para pinocembrina no incorporada), el experimento se realiza por triplicado.

La Tabla 7-17 muestra los resultados obtenidos y los cálculos realizados. Observe que la eficiencia de incorporación es de 99.9%, es decir, la pinocembrina se

incorpora en el liposoma casi en su totalidad. Para obtener este dato se emplea la Ecuación 7-2 $Abs_{290\text{ nm}} = 0.0966 \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) + 0.0035$

Tabla 7-17. Eficiencia de incorporación de pinocembrina 4:1

Concentración inicial: 0.662 mg/mL Mediciones	Absorbancia a 290 nm	Conversión utilizando la Ecuación 7-2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Factor de Dilución: 5 Cantidad de pinocembrina en el filtrado (mg/ mL)	%Retenido utilizando Ecuación 4-15
1	0.021	0.188	0.001	99.97
2	0.026	0.240	0.001	99.96
3	0.032	0.302	0.001	99.95
Promedio	0.026 ± 0.005	0.243 ± 0.026	0.001 ± 0.000	99.96 ± 0.01

7.6 DSPC:pinocembrina:colesterol

En los siguientes sistemas liposomales, se incluyó pinocembrina y colesterol, variando únicamente la cantidad de colesterol, en relación molar 4:1 y 2:1

7.6.1 Calorimetría diferencial de barrido

Observe en la Gráfica 7-13 lo que sucede al agregar colesterol en relación molar 2:1 y 4:1 al sistema que incluye DSPC y pinocembrina. Si bien el pico se ensancha y con ello el valor de $T_{1/2}$ aumenta, con colesterol en relación molar 2:1 ya no se observa la formación de dominios, que resultaba por la presencia de 2 picos en el termograma, como sucedió en el sistema que contiene únicamente DSPC:pinocembrina. Es importante mencionar que debido a que los escaneos vuelven a ser no idénticos, se descarta el primero puesto que el sistema aún no se encuentra en equilibrio ya que la cantidad de pinocembrina tiene un reacomodo en la bicapa. Por otro lado, con la relación 4:1, se observa un ligero hombro en el pico de transición principal, indicando que el sistema empieza a presentar formación de dominios, por lo que se analizan los datos obtenidos por deconvolución (Gráfica 7-14 y Tabla 7-18). La Tabla 7-18 indica los parámetros asociados a la Gráfica 7-13.

Gráfica 7-13. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:colesterol:pinocembrina

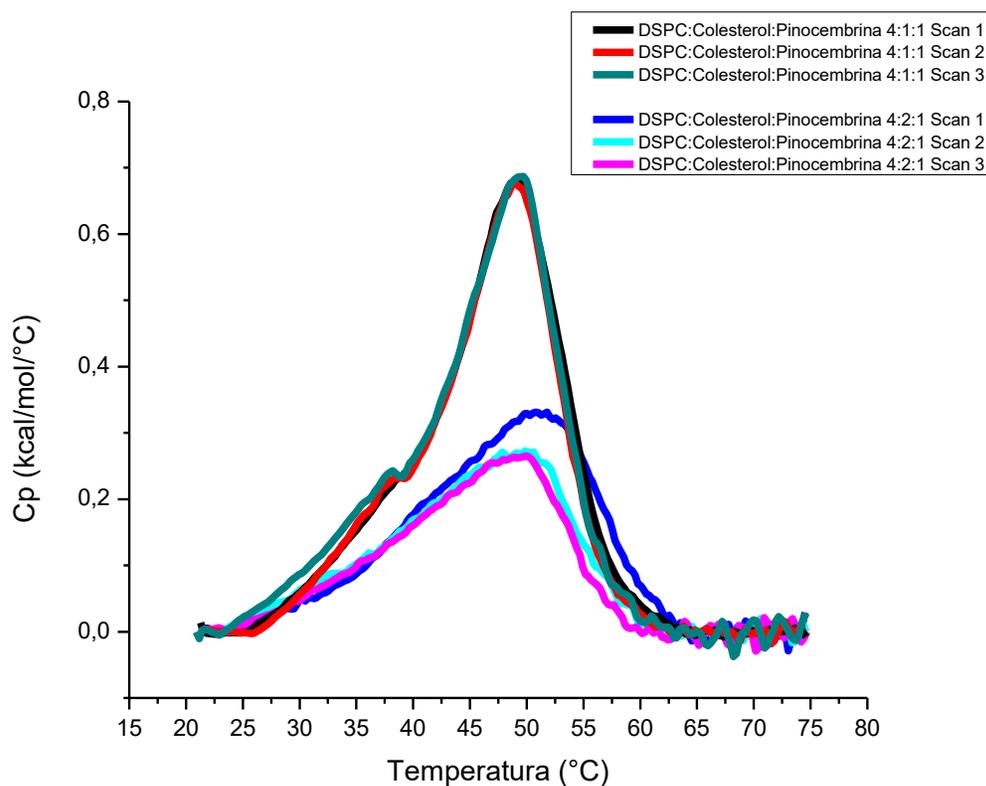


Tabla 7-18. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:colesterol:pinocembrina 4:1

Escaneos	Relación molar 4:1			Relación molar 2:1		
	ΔH (kcal/mol)	Tm (°C)	T _{1/2} (°C)	ΔH (kcal/mol)	Tm (°C)	T _{1/2} (°C)
1	9.37	49.3	11.5	-	-	-
2	9.02	48.8	11.0	4.04	47.9	15.5
3	9.51	49.7	11.3	4.22	49.9	15.5
Promedio	9.30 ± 0.2	49.3 ± 0.5	11.3 ± 0.3	4.13 ± 0.12	48.9 ± 1.4	15.5 ± 0.0

En los dos sistemas, el valor de entalpía decrece debido quizá a que la inclusión de colesterol y pinocembrina disminuyen las interacciones entre las cadenas o el número de interacciones de Van de Waals. Dicho en otras palabras, los aditivos les estorban a las cadenas hidrofóbicas para que maximicen sus interacciones, en consecuencia, la entalpía se abate puesto que hay menos interacciones para

romper y se necesita menor energía. Además, el valor de T_m desplazado a la izquierda es muy similar con ambas relaciones molares, concuerda con lo anterior mencionado, es decir, que el colesterol le da fluidez a la membrana. Por otra parte, era de esperarse que se presentara un valor de $T_{1/2}$ tan grande, ya que se encuentran presentes 3 componentes en la bicapa, evidentemente entre mayor sea la cantidad de aditivo, más ancho será el pico.

Gráfica 7-14. Deconvolución de picos de DSPC:pinocembrina:colesterol 4:1

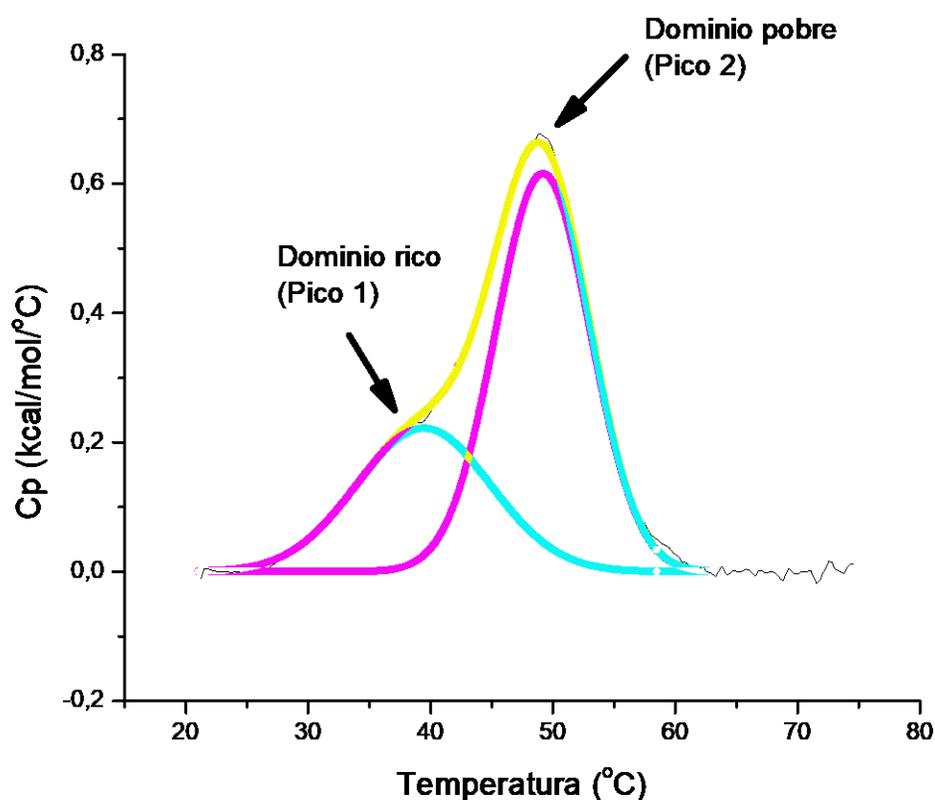


Tabla 7-19. Parámetros fisicoquímicos obtenidos por deconvolución DSPC:pinocembrina:colesterol 4:1

Escaneo	ΔH_1 (kcal/mol)	ΔH_2 (kcal/mol)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	$T_{1/2 1}$ (°C)	$T_{1/2 2}$ (°C)
2	3.06	5.95	39.4	49.2	10.9	7.7
3	5.61	4.24	42.3	49.4	16.2	6.9
Promed.	4.33 ± 1.81	5.09 ± 1.21	40.9 ± 2.0	49.3 ± 0.2	13.6 ± 3.7	7.3 ± 0.6

Los datos obtenidos muestran que existen dominios ricos y pobres con comportamiento termotrópico diferente, ocasionando los picos observados. Ambos picos contienen colesterol y pinocembrina, pero probablemente, por el valor alto de $T_{1/2}$ el pico 1 sea el dominio rico en pinocembrina/colesterol y el pico 2 el dominio pobre en pinocembrina/colesterol. No es posible con estos datos deducir, cuál pico posee mayor cantidad de cada molécula. Se puede deducir por el valor de T_m que entre mayor sea la cantidad de pinocembrina/colesterol existente en la bicapa, mayor será la fluidez. En términos de entalpía, menor será la energía que se necesita para pasar al estado fluido cuando existe mayor cantidad de pinocembrina/colesterol.

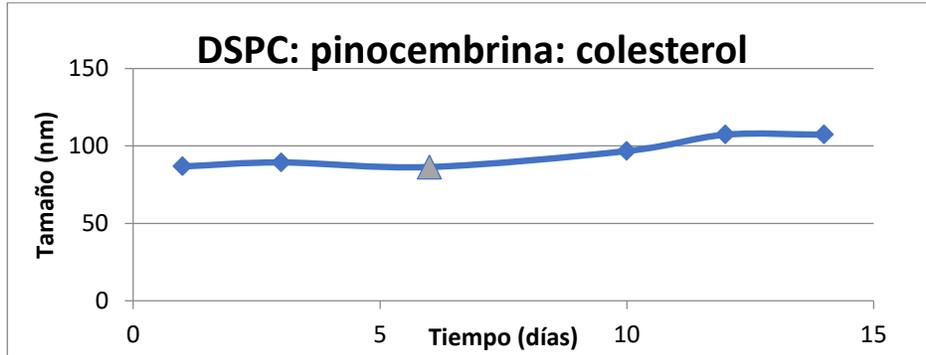
7.6.2 Tamaño y potencial Z

Con base en lo reportado en Tabla 7-20 el tamaño inicial es menor a los 100 nm en la población monodispersa. Al día 6 aparece otra población pequeña de liposomas micrométricos que aumenta su intensidad y su tamaño al pasar el tiempo. Es hasta el día 12 que se observa precipitado en la disolución (indicado en la tabla con una flecha). En la Gráfica 7-15 se evidencia el aumento del tamaño de partícula de la población original; se representa con un triángulo verde el día en que surge la segunda población.

Tabla 7-20. Tamaño de partícula de DSPC:pinocembrina:colesterol

Día/ Poblaciones	Tamaño (nm)		Intensidad (%)		PDI
	1	2	1	2	
1	86.77 ± 0.74	-	100	-	0.143 ± 0.012
3	89.37 ± 0.70	-	100	-	0.138 ± 0.016
6	86.41 ± 0.76	1503 ± 2604	99.5	0.5	0.157 ± 0.016
10	96.73 ± 1.14	4603 ± 214	98.1	1.9	0.183 ± 0.015
12↓	107.3 ± 1.63	4662 ± 156.9	96.2	3.8	0.216 ± 0.027
14	107.3 ± 0.78	4978 ± 136.1	98	2	0.201 ± 0.012

Gráfica 7-15. DSPC:pinocembrina:colesterol en función del tiempo

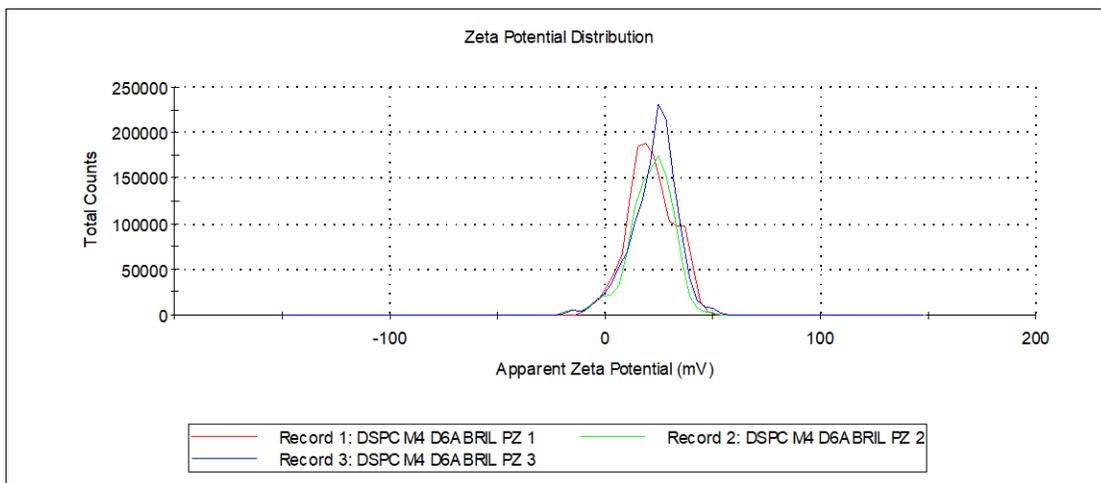


Los resultados obtenidos de potencial Z se encuentran en la Tabla 7-21. La presencia de colesterol no modifica considerablemente el valor del potencial. En la Figura 7-10 se muestra ilustrativamente que el valor obtenido es aproximadamente 20 mV, indicando que el sistema es relativamente estable en disolución.

Tabla 7-21. Potencial Z de DSPC:pinocembrina:colesterol

Mediciones	Potencial Z (mV)
1	21.0
2	21.2
3	22.4
Promedio	21.5 ± 0.76

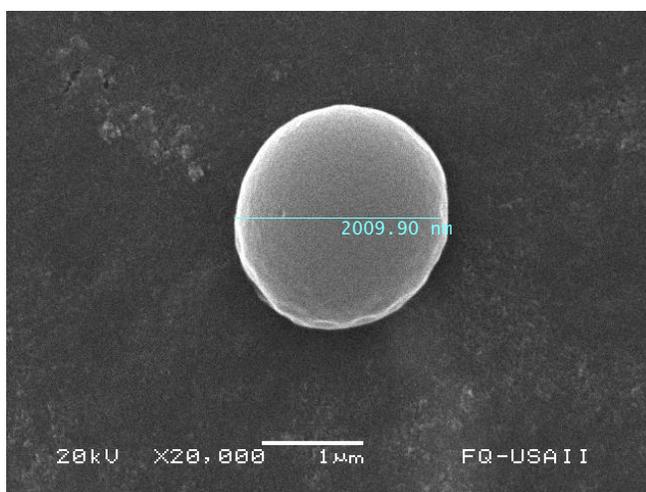
Figura 7-10. Potencial Z de DSPC:pinocembrina:colesterol



7.6.3 Morfología

La morfología de los liposomas DSPC:pinocembrina:colesterol se muestra en la Figura 7-11. Observe que la presencia de colesterol le confiere al liposoma una forma totalmente esférica.

Figura 7-11. Imagen de DSPC:pinocembrina:colesterol obtenida por SEM



7.6.4 Eficiencia de incorporación

La Tabla 7-22 muestra el porcentaje de incorporación de pinocembrina al sistema. A pesar de que estudios reportan que el colesterol es un agente que mejora la incorporación de moléculas hidrofóbicas en la bicapa (Tsai & Rizvi, 2017), esto no sucede así para pinocembrina y en este estudio se comprueba que para tales sistemas no es necesario añadir colesterol.

Tabla 7-22. Cálculo de porcentaje de encapsulación de DSPC:pinocembrina:colesterol usando centrifugación

Concentración inicial: 0.684 mg/mL Medición	Abs 290 nm	Conversión utilizando Ecuación 7-2($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Factor de dilución: 5 Concentración de pinocembrina en el filtrado (mg/ mL)	%Retenido utilizando Ecuación 4-15
1	0.330	3.41	0.017	99.74
2	0.304	3.14	0.016	99.76
3	0.354	3.66	0.018	99.72
Promedio	0.330 ± 0.025	3.40 ± 0.26	0.017 ± 0.001	99.74 ± 0.020

Para comprobar que la cantidad de pinocembrina se encuentra efectivamente en el liposoma, se realizó la centrifugación inversa. Note en la Tabla 7-23 que la cantidad obtenida es cercana a la concentración añadida al inicio, por lo que se comprueba que el proceso de incorporación de tal molécula es eficiente.

Tabla 7-23. Cálculo de porcentaje de encapsulación de DSPC:pinocembrina:colesterol usando centrifugación inversa

Concentración inicial: 0.684 mg/mL Medición	Abs 290 nm	Conversión utilizando Ecuación 7-2($\mu\text{g/mL}$)	Factor de dilución: 100 Concentración de pinocembrina en el liposoma (mg/ mL)	Total Filtrado+liposoma (mg/ mL)
1	0.642	6.656	0.666	0.683
2	0.618	6.406	0.641	0.656
3	0.64	6.635	0.664	0.682
Promedio	0.633 ± 0.013	6.566 ± 0.139	0.657 ± 0.014	0.674 ± 0.015

7.7 DSPC:resazurina

En este sistema, se pretende incorporar moléculas de carácter hidrofílico.

La ventaja de la presencia de la molécula de resazurina en el liposoma es que ésta absorbe a una longitud de onda de 610 nm, que es diferente a la de la molécula hidrofóbica utilizada en estos estudios (pinocembrina), de esta manera se evitan problemas de resolución entre las longitudes de onda de máxima absorción de ambas moléculas.

7.7.1 Calorimetría diferencial de barrido

Observe el termograma mostrado en la Gráfica 7-16, la presencia de resazurina en el liposoma no modifica el perfil térmico, confirmándose la hipótesis de que la molécula se incorpora al centro acuoso del liposoma. Los escaneos sobrelapados son idénticos y el termograma es similar al obtenido con el lípido puro (Ver DSPC en CHCl_3), siendo este comportamiento típico de moléculas hidrofílicas (El Maghraby, Williams, & Barry, 2005).

La Tabla 7-24 indica los parámetros obtenidos por DSC. El valor de $T_{1/2}$ es de 1.5, lo que quiere decir que la resazurina no se incorpora dentro de las cadenas lipídicas. La temperatura de transición es la misma que presenta el lípido puro. En cambio, el valor de entalpía es mayor, pudiendo suceder que exista algún tipo de interacción con las cabezas polares del fosfolípidos orientadas hacia el centro acuoso, necesiándose mayor energía para vencer estas fuerzas y realizar la transición de fase.

Gráfica 7-16. DSC escaneos sobrelapados de DSPC:resazurina 4:1

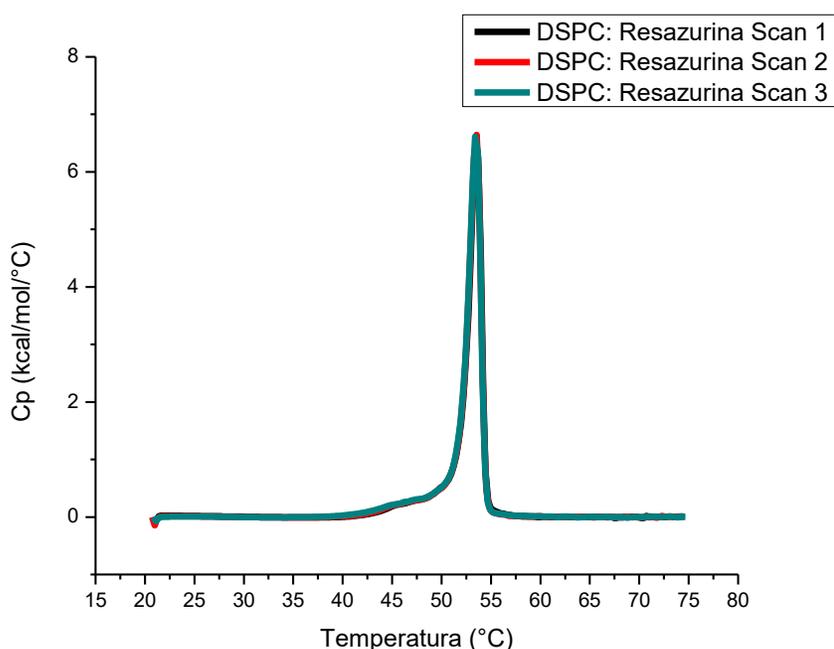


Tabla 7-24. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:resazurina

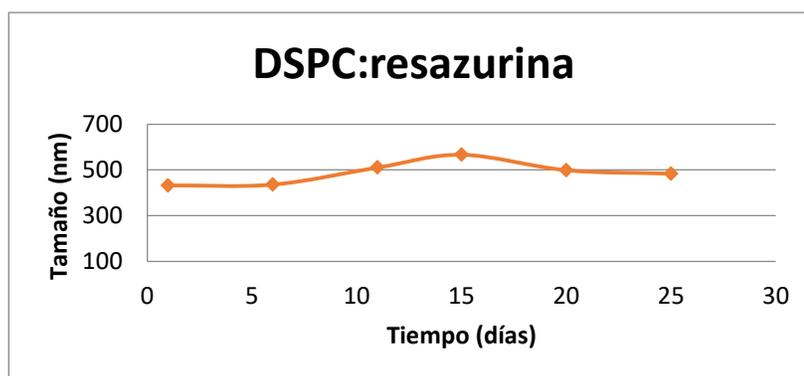
Escaneos	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
1	1.38	53.4	1.5
2	1.39	53.5	1.5
3	1.42	53.4	1.5
Promedio	1.39 ± 0.22	53.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0

7.7.2 Tamaño de partícula

Según lo mostrado en la Gráfica 7-17, se observa que la inclusión de moléculas de resazurina ocasiona un aumento en el tamaño de los liposomas, sugiriendo

también que la molécula es capaz de interactuar con las cabezas polares del fosfolípido, provocando que el liposoma se agrande.

Gráfica 7-17. Tamaño de liposomas de DSPC: resazurina en función del tiempo



El sistema presenta buena estabilidad en disolución puesto que no se perciben agregados visibles (Figura 7-12) posteriores al día 20. La Tabla 7-25 indica los valores del cambio del tamaño al transcurrir el tiempo, obteniéndose una población monodispersa única.

Figura 7-12. Solución liposomal de DSPC:resazurina



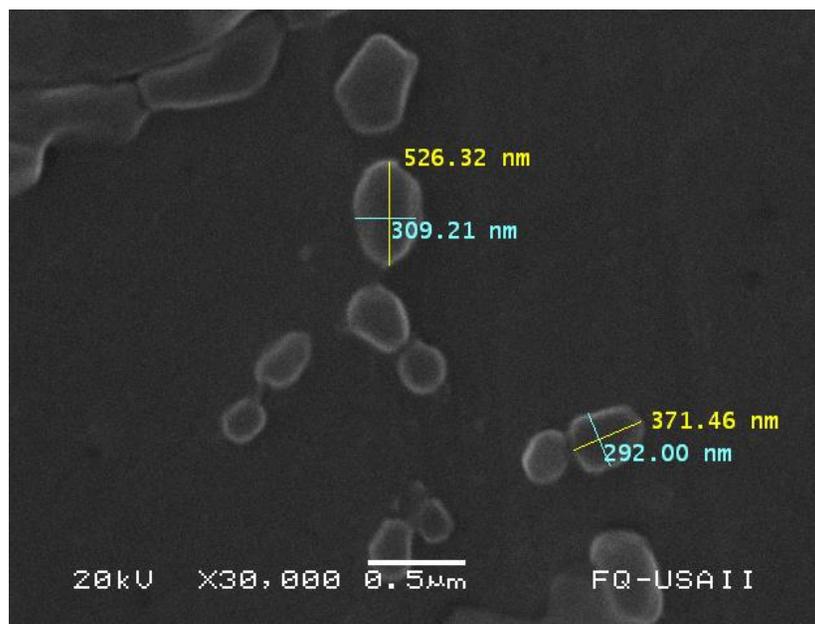
Tabla 7-25. Tamaño de liposomas de DSPC:resazurina obtenido por DLS

Día	Tamaño (nm)	Intensidad (%)	Índice de polidispersidad
1	432.1 ± 27.11	100	0.344 ± 0.075
6	435.8 ± 45.15	100	0.172 ± 0.062
11	510.4 ± 30.7	100	0.132 ± 0.113
15	566.2 ± 39.6	100	0.147 ± 0.087
20	498.7 ± 22.93	100	0.119 ± 0.054
25	483.5 ± 25.29	100	0.150 ± 0.134

7.7.3 Morfología

La Figura 7-13 muestra que los liposomas adquieren una morfología irregular, debido a la probable inserción no homogénea de resazurina entre las cabezas polares. Además, en la microscopía se pueden observar que los liposomas tienden a agregarse.

Figura 7-13. Imagen de DSPC:resazurina obtenida por SEM



7.7.4 Porcentaje de encapsulación

Como se mencionó en el apartado 4.5.2 Eficiencia de encapsulación, se le llamará porcentaje de encapsulación a la cantidad de resazurina que se aloja en el centro acuoso del liposoma.

Para corroborar que las moléculas de resazurina se encuentran dentro del liposoma, se realizó la centrifugación inversa: los liposomas retenidos en la membrana del filtro utilizado son vaciados al tubo colector (Figura 7-14) (Ver 4.4 Ultra). Se realizaron varios lavados para eliminar el exceso de resazurina presente en el medio (fuera del liposoma) y posteriormente se leyó la absorbancia a la longitud de onda correspondiente, utilizando:

$$\text{Ecuación 7-4 } Abs(610 \text{ nm}) = 0.0883 \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) + 0.0005.$$

Los resultados se muestran en la Tabla 7-26. Observe que concentración real incorporada al liposoma es aproximadamente 50% y la restante probablemente no fue encapsulada debido a que la molécula tiene una afinidad alta por el agua y no distingue entre incorporarse en el agua dentro del liposoma o quedarse en el medio.

Figura 7-14. Liposoma de DSPC:resazurina retenido en el filtro Amicon



Tabla 7-26. Cálculo de cantidad de resazurina incorporado al liposoma usando centrifugación inversa.

Concentración inicial: 0.63 mg/mL Mediciones	Abs 610nm	Conversión utilizando Ecuación 7-2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Factor de dilución: 67 Concentración en el liposoma (mg/mL)	Porcentaje de encapsulación utilizando Ecuación 4-16
1	0.36	5.12	0.34	54.58
2	0.34	4.88	0.33	52.07
3	0.32	4.62	0.31	49.25
Promedio	0.34 ± 0.02	4.87 ± 0.25	0.33 ± 0.02	51.97 ± 2.67

7.8 DSPC:resazurina:pinocembrina

La cantidad de moléculas que se pretende incorporar al liposoma, se seleccionó basada en 2 criterios: i) para la masa de resazurina, se utilizó la misma del experimento anterior (Ver DSPC:resazurina) porque se observó que ésta no provocaba interferencias en la bicapa ni presentaba inestabilidades en disolución; ii) la masa de pinocembrina se seleccionó en base a experimentos que se describirán posteriormente (Ver Sistemas con pinocembrina), se buscaba una

cantidad por debajo de la separación de fases con el fin de estudiar únicamente el comportamiento de las moléculas al incorporarse en conjunto en el liposoma.

7.8.1 Calorimetría diferencial de barrido

Observe en la Gráfica 7-18 que las condiciones seleccionadas resultaron en lo que se pretendía con el criterio mencionado, es decir, se observa un pico único de transición principal. Note que la cantidad elegida de pinocembrina se incorpora en la bicapa y provoca un ensanchamiento del pico, es decir, un valor de $T_{1/2}$ aumentado y un desplazamiento de T_m a la izquierda y con ello fluidización de la membrana. Sin embargo, la cantidad de pinocembrina no ocasiona un reacomodo de las moléculas al aplicarse calor, ya que los tres escaneos son idénticos. Por otra parte, el aumento de entalpía con respecto al fosfolípido puro (10651.5 cal/mol) también se atribuye a la presencia de resazurina, ya que se presentó éste mismo comportamiento en el sistema DSPC:resazurina (13951.2 cal/mol). Los parámetros fisicoquímicos mencionados corresponden a los valores de la Tabla 7-27.

Gráfica 7-18. Escaneos sobrelapados de DSPC:resazurina:pinocembrina obtenidos por DSC

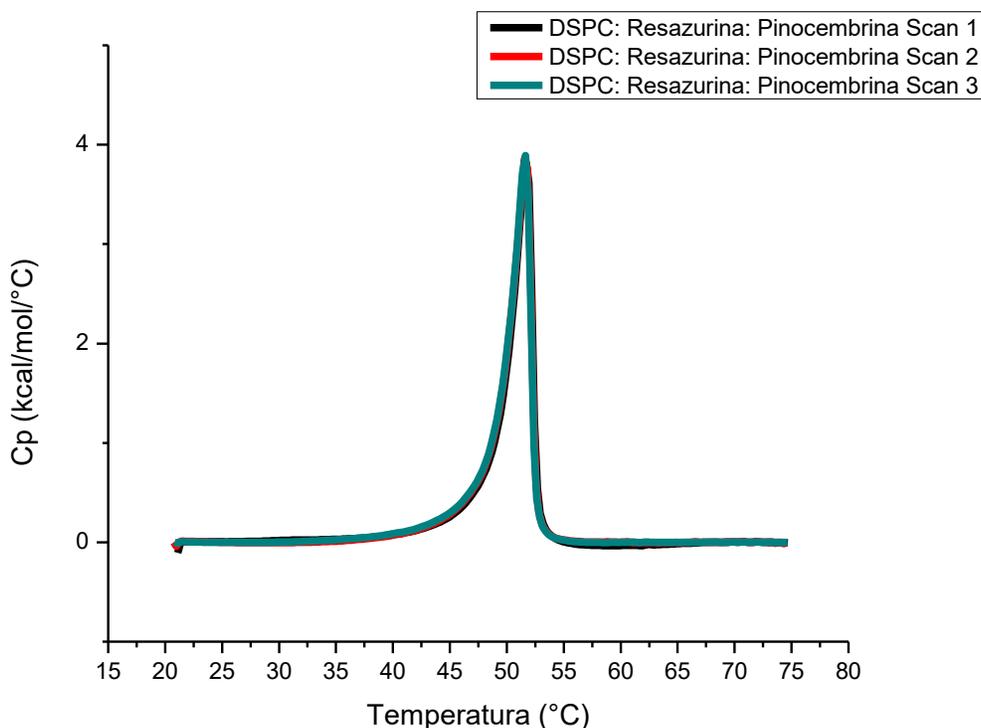


Tabla 7-27. Parámetros fisicoquímicos de DSPC:pinocembrina resazurina 8:1:1 obtenidos por DSC

Escaneo	ΔH (kcal/mol)	T _m (°C)	T _{1/2}
1	1.14	51.7	2.2
2	1.17	51.6	2.2
3	1.18	51.6	2.2
Promedio	1.16 ± 0.22	51.6 ± 0.1	2.2 ± 0.0

7.8.2 Tamaño

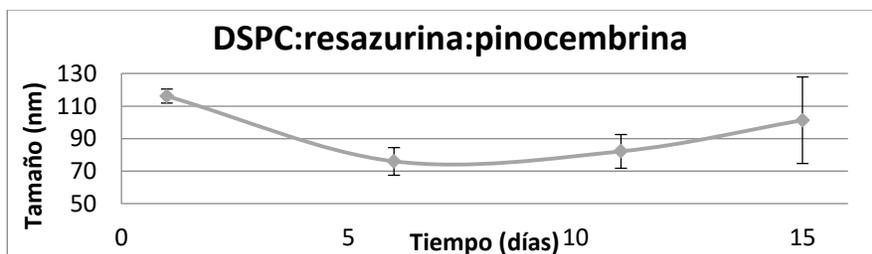
La Tabla 7-28 muestra los resultados correspondientes de tamaño DSPC: resazurina: pinocembrina. Desde el primer día se presentan dos poblaciones. Observe que conforme avanza el tiempo (

Gráfica 7-19), el índice de polidispersidad aumenta drásticamente, indicando que están presentes otras poblaciones con tamaños muy diferentes entre ellas, que conducen a la inestabilidad de la muestra.

Tabla 7-28. Tamaño de DSPC:resazurina:pinocembrina obtenido por DLS

Día	Tamaño (nm)			Intensidad (%)			PDI
	1	2	3	1	2	3	
1	116.1 ± 4.3	1688 ± 2924	-	99.4 ± 1.1	0.6 ± 1.1	-	0.178 ± 0.00
6	76.0 ± 8.5	313.4 ± 216.1	1853 ± 3210	67.7 ± 16.2	29.7 ± 11.8	2.6 ± 11.8	0.613 ± 0.07
11	82.3 ± 10.3	454.9 ± 263.6	1748 ± 3027	61.3 ± 5.2	34.5 ± 9.1	4.2 ± 7.3	0.78 ± 0.089
15	101.3 ± 26.5	808.7 ± 411.5	408.5 ± 54.2	52 ± 8.4	36.8 ± 3.7	9.7 ± 9.5	0.854 ± 0.14

Gráfica 7-19. Tamaño de DSPC:resazurina:pinocembrina a través del tiempo

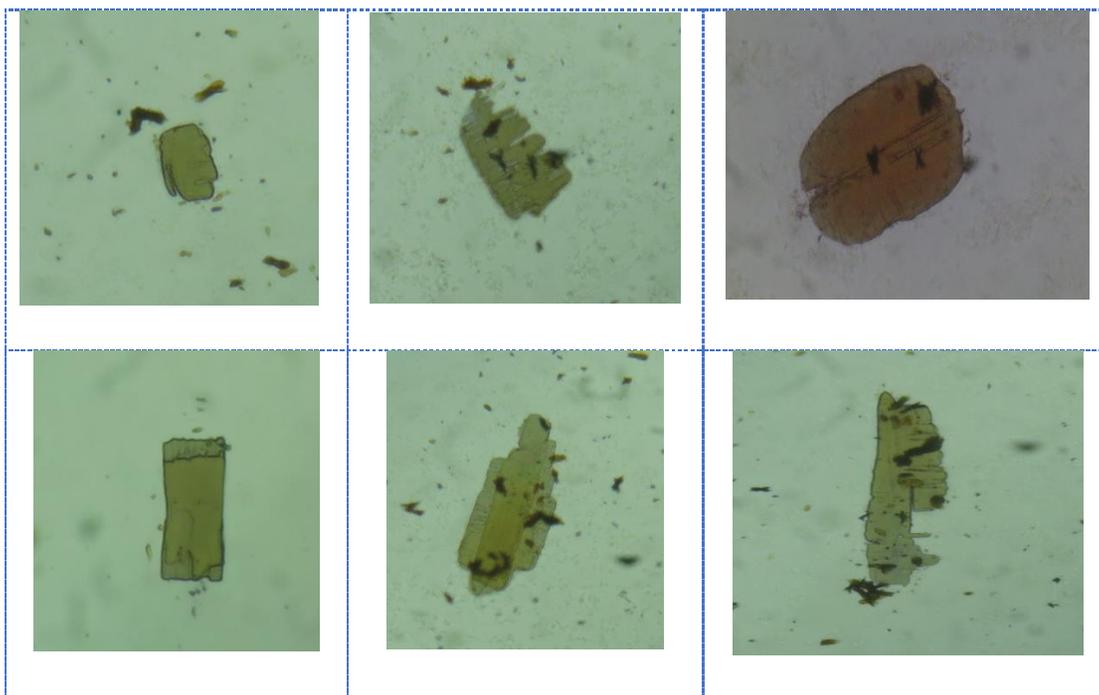


Al día 15 se presenta la formación de partículas doradas dentro de la solución (Figura 7-15). Al ser observadas por microscopía óptica, las partículas se observan como cristales de forma irregular y color café (Figura 7-16).

Figura 7-15. Formación de partículas doradas dentro de la solución liposomal DSPC:resazurina:pinocembrina



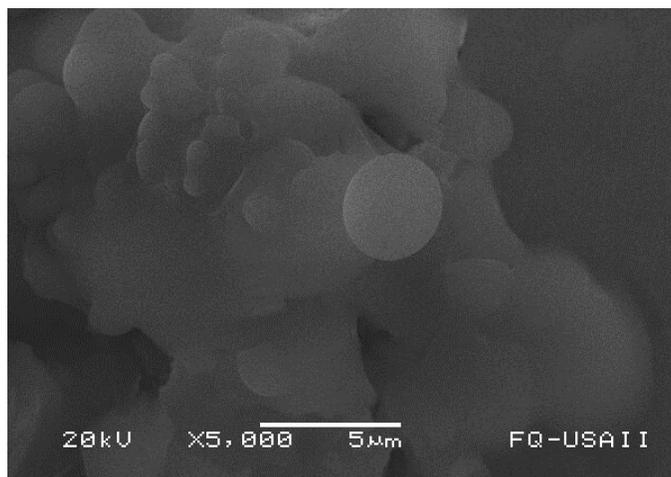
Figura 7-16. Cristales de DSPC:pinocembrina:resazurina visualizados por microscopía óptica



7.8.3 Morfología

La Figura 7-17 muestra la morfología de los liposomas, la mayoría es de forma circular. Observe que es posible distinguir agregados de liposomas.

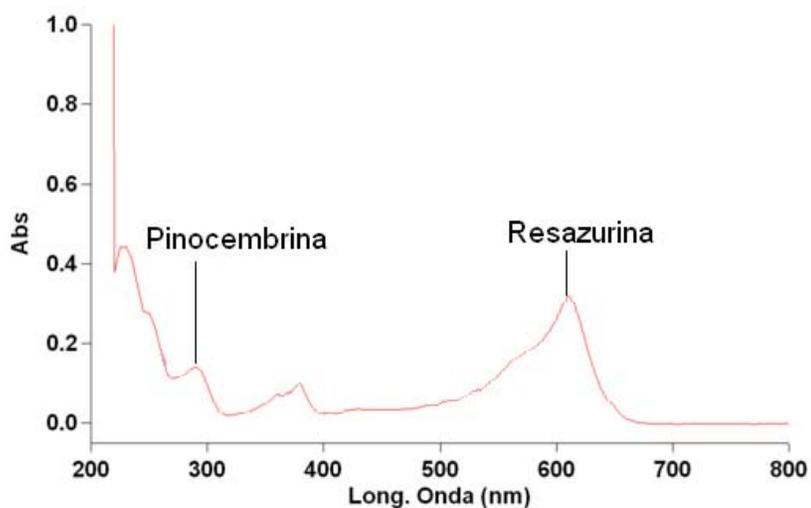
Figura 7-17. Imagen de DSPC:resazurina:pinocembrina obtenida por SEM



7.8.4 Eficiencia de incorporación y encapsulación.

La cantidad de pinocembrina y resazurina en la muestra se determinó por medio de espectrofotometría UV-VIS. La Figura 7-18 muestra el espectro de absorción de liposomas DSPC:resazurina:pinocembrina.

Figura 7-18. Espectro de absorción de liposoma DSPC:resazurina:pinocembrina



Los resultados de la Tabla 7-29, que refieren a la cantidad de pinocembrina en el filtrado o sobrenadante, se obtuvieron midiendo absorbancia a 290 nm. Observe que la presencia de otra molécula, como resazurina, no interfiere con la eficiencia de incorporación de pinocembrina, pues ésta sigue siendo mayor al 99%.

Tabla 7-29. Cálculo de eficiencia de incorporación de pinocembrina en el sistema DSPC:pinocembrina:resazurina usando centrifugación

Concentración inicial: 0.35 mg/mL Mediciones	Abs 290 nm	Conversión utilizando Ecuación 7-2($\mu\text{g/mL}$)	Factor de dilución: 5 Concentración de pinocembrina en el filtrado (mg/mL)	% Eficiencia según Ecuación 4-15
1	0.165	1.69	0.004	99.76
2	0.136	1.39	0.003	99.80
3	0.157	1.60	0.004	99.77
Promedio	0.153 ± 0.015	1.56 ± 0.16	0.004 ± 0.0004	99.78 ± 0.02

Para verificar que la cantidad de pinocembrina se encuentra en el liposoma, la Tabla 7-30 indica la cantidad real y los resultados obtenidos por centrifugación inversa. Con este procedimiento se comprueba que la pinocembrina se puede incorporar casi en su totalidad.

Tabla 7-30. Cálculo de eficiencia de incorporación de pinocembrina en el sistema DSPC:pinocembrina:resazurina usando centrifugación inversa

Concentración inicial: 0.354 mg/mL Medición	Abs 290 nm	Conversión utilizando Ecuación 7-2 ($\mu\text{g/mL}$)	Factor de dilución: 200 Concentración de pinocembrina en el liposoma (mg/ mL)	Total Filtrado+ liposoma (mg/ mL)
1	0.122	1.24	0.248	0.252
2	0.171	1.77	0.350	0.353
3	0.153	2.07	0.313	0.317
Promedio	0.149 ± 0.025	1.69 ± 0.42	0.303 ± 0.052	0.307 ± 0.05

Por otro lado, al determinar la concentración de resazurina encapsulada (Tabla 7-31), se encuentra que sólo la mitad de la concentración añadida se encuentra en el núcleo del liposoma, probablemente se deba a que éste al ser unilaminar y menor a 100 nm, el espacio del núcleo o centro acuoso limita la posibilidad de encapsulación de la molécula. Es importante resaltar que el resultado obtenido es el mismo que se obtuvo sin pinocembrina (51.9 %), lo cual sugiere que ambas moléculas (resazurina y pinocembrina) no se estorban entre ellas.

Tabla 7-31. Cálculo de la cantidad de resazurina incorporada al liposoma

Concentración inicial: 0.65 mg/mL Mediciones	Abs 610 nm	Conversión utilizando Ecuación 7-4 (µg/mL)	Factor de dilución: 67 Concentración en el liposoma (mg/mL)	% Encapsulación según Ecuación 4-16
1	0.386	5.57	0.37	57.08
2	0.326	4.69	0.31	48.04
3	0.365	5.26	0.35	53.92
Promedio	0.359 ± 0.030	5.18 ± 0.45	0.35 ± 0.03	53.02 ± 4.59

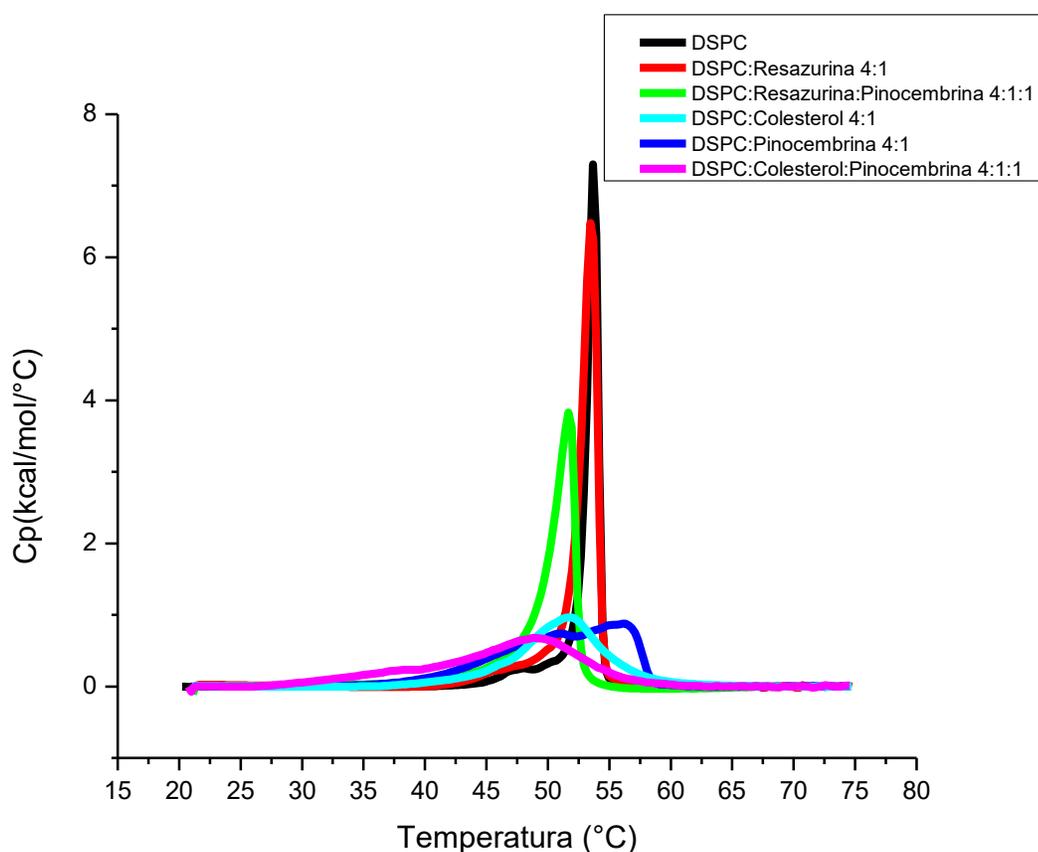
Capítulo 8 Discusión. Comportamiento fisicoquímico de liposomas de DSPC

En esta sección se presentará el análisis en conjunto de los sistemas elaborados de DSPC con la inclusión de diferentes moléculas de interés biológico.

8.1 Comportamiento termotrópico de la bicapa lipídica

8.1.1 Transición de fase

Gráfica 8-1. Termograma de sistemas liposomales



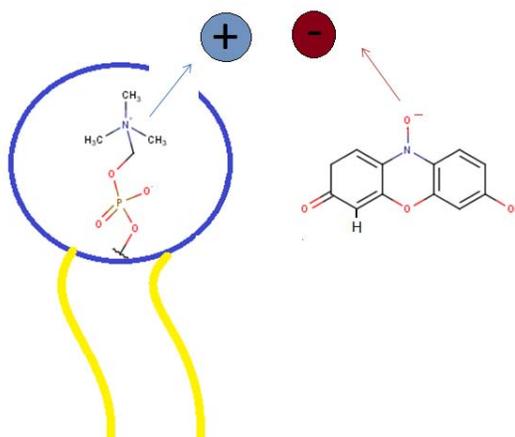
La Gráfica 8-1 muestra el termograma de los sistemas elaborados. Observe que con la adición de otros componentes al sistema, el perfil térmico característico del DSPC puro va modificándose.

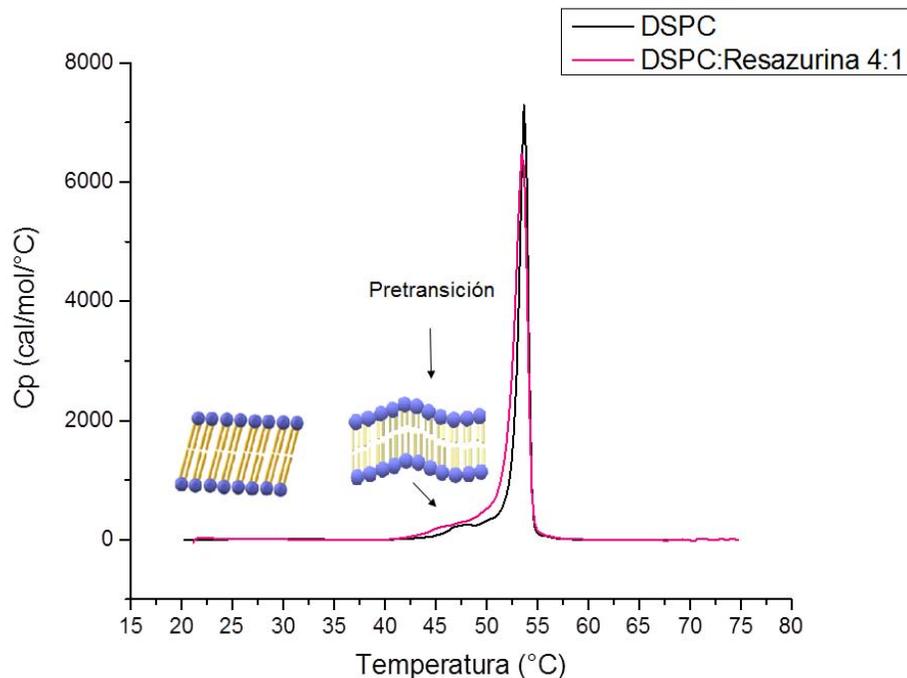
En la Figura 8-1 puede observar que el sistema DSPC: resazurina presenta una traza calorimétrica similar a la que se obtiene con DSPC puro. Al obtener un

termograma similar, se puede deducir que las moléculas hidrofílicas no se incorporan dentro de la bicapa lipídica porque es energéticamente costoso para ellas incorporarse, es decir, habría interacciones polares-no polares. En específico, la resazurina, al ser una sal sódica, forma interacciones electrostáticas con el agua y tiene preferencia por ésta, pudiéndose encontrar en el medio (fuera del liposoma) o en el centro acuoso (en el núcleo del liposoma).

El único sistema de los liposomas que se presentan en este estudio, que presenta pretransición en el termograma es DSPC. La pretransición observada puede explicarse en términos de interacciones con las cabezas de grupo de los fosfolípidos y cambios conformacionales. Antes de la pretransición, las cadenas hidrocarbonos están en configuración trans (arreglos inclinados unidimensionales) y cambian a arreglos dimensionales con ondulaciones periódicas (El Maghraby et al., 2005), ocasionados a medida que se reduce la rigidez de la membrana al aumentar la energía térmica, entonces la membrana rígida se vuelve inestable y se produce ondulación por la inclinación molecular como resultado de interacciones estéricas entre moléculas vecinas (Lubensky & MacKintosh, 1993). éste cambio conformacional permite que los grupos polares de los fosfolípidos que se encuentran rodeando el núcleo del liposoma, en específico el nitrógeno con carga positiva, interactúe electrostáticamente con la molécula de resazurina que tiene un oxígeno cargado negativamente y que es altamente resonante. Por lo tanto, la desaparición de la pretransición confirma la encapsulación de resazurina en el liposoma.

Figura 8-1. Interacciones electrostáticas de grupos polares del fosfolípido con la resazurina durante la pretransición observada en el perfil termográfico.





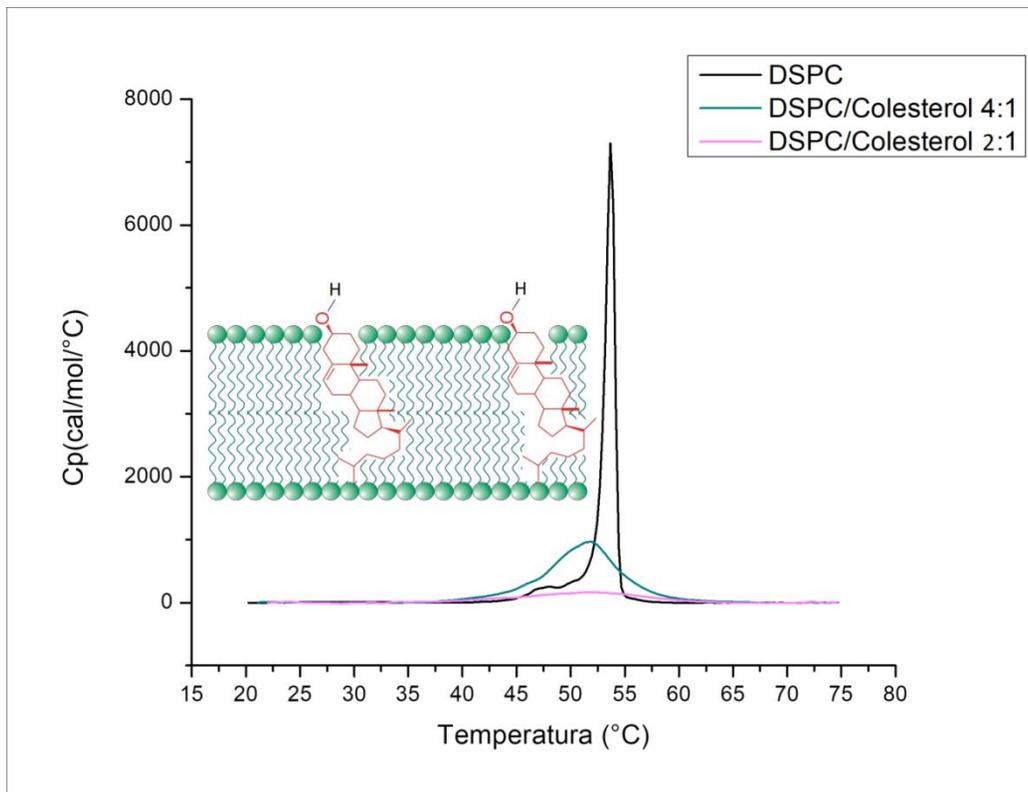
En el caso contrario, al incorporarse moléculas hidrofóbicas, como pinocembrina y colesterol (DSPC:pinocembrina, DSPC:colesterol), el perfil térmico cambia considerablemente con respecto al termograma del lípido puro: se modifica la altura y ancho del pico; confirmándose así que ambas moléculas se incorporan dentro de la bicapa, hipotéticamente entre los primeros carbonos de la cadena de acilo de los fosfolípidos.

Molecularmente, la explicación de que los termogramas muestren un abatimiento del pico de transición principal es la siguiente:

El colesterol, se inserta con su grupo hidroxilo polar orientado con la fase acuosa y el anillo esteroide hidrofóbico paralelo y enterrado en las cadenas de hidrocarbóno de los fosfolípidos(Ohvo-Rekil, 2002). El colesterol se intercala en la membrana por medio de interacciones de Van der Waals. En este estudio se utilizó 20% y 33% mol total de colesterol; entre mayor sea la cantidad de colesterol agregado, más interacciones formará con la bicapa, que resultará en reducciones del pico de transición más drásticas del termograma (Figura 8-2). Los resultados concuerdan con otros estudios que refieren que la cantidad ascendente de colesterol agregada tiende a abatir por completo la transición de fase en liposomas (Maulik P. R.,

1996), este estudio también evidencia que con cantidades de 33% mol total en liposomas de diestearoilfosfatidilcolina la membrana se encuentra fluidizada, ya que la señal calorimétrica correspondiente a la transición de fase desaparece.

Figura 8-2. Interacción de colesterol con los fosfolípidos del liposoma.



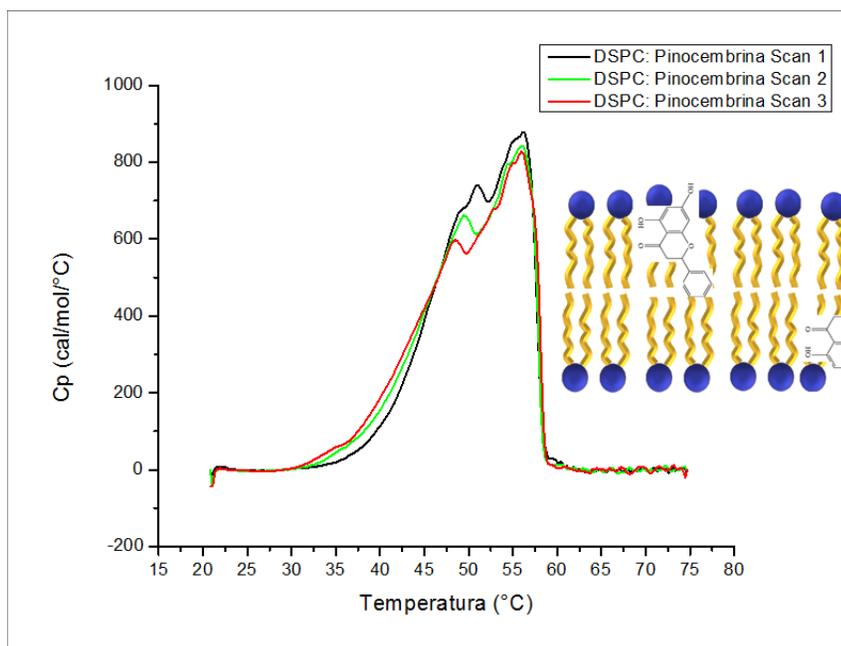
Al igual que el colesterol, la pinocembrina actúa como un espaciador estructural, intercalándose entre los primeros carbonos de las cadenas de acilo de los fosfolípidos mediante fuerzas hidrofóbicas (Figura 8-3), causando una desestabilización de la bicapa, explicándose de esta manera que la traza calorimétrica mostrará una reducción y ensanchamiento del pico.

Se sabe que los flavonoides se unen a través de la cabeza polar de los fosfolípidos, formando así complejos fisicoquímicos reversibles (Saija et al., 1995). Estos complejos reversibles se llevan a cabo gracias a que la pinocembrina es un flavonoide y por lo tanto, es considerada como un protonóforo (Van Dijk, Driessen, & Recourt, 2000), es decir, es una molécula aromática que es capaz de mover protones a través de las bicapas lipídicas y esto es observable con la traza

calorimétrica, pues los complejos formados con la pinocembrina a altas concentraciones se acomodan en la bicapa y se manifiestan en el termograma como escaneos no idénticos.

Para poder explicar la presencia de un pico doble asimétrico de la Figura 8-3, se debe mencionar que a concentraciones de 0.66 mg/mL de pinocembrina (relación molar 4:1) se puede suponer que las moléculas se agregan entre sí en grupos o dominios dentro de la bicapa; puesto que dicha forma se mantiene durante el proceso de enfriamiento y calentamiento llevado a cabo por DSC, se infiere que el proceso es reversible y que tales dominios coexisten independientemente de la temperatura que se aplique al sistema. Es preciso explicar el comportamiento de la pinocembrina en los liposomas, por lo que se aborda este tema a mayor detalle, mediante los datos obtenidos con la fabricación de sistemas de pinocembrina a diferentes concentraciones.

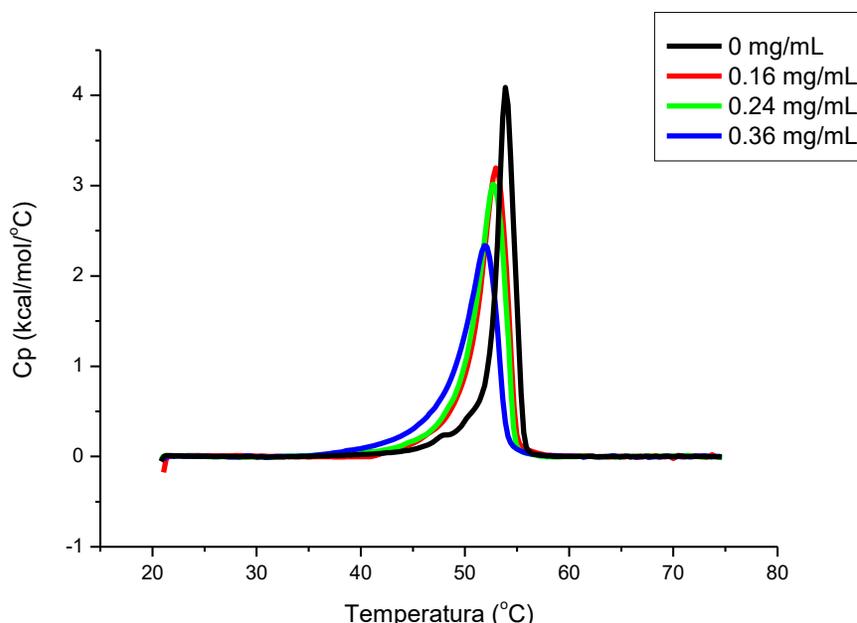
Figura 8-3. Doble pico asimétrico en perfil térmico y representación de la intercalación de pinocembrina en la bicapa lipídica



A continuación se muestran los resultados obtenidos con concentraciones de pinocembrina de 0.16 a 0.36 mg/mL. Se realizaron tres escaneos de DSC para

cada concentración de pinocembrina. Puesto que el perfil térmico del triplicado es idéntico en concentraciones bajas, en la Gráfica 8-2 se muestra únicamente una traza calorimétrica para cada sistema de pinocembrina de concentración 0.1 a 0.36 mg/mL. Observe que la forma del pico es la misma, pero se presenta un desplazamiento a valores menores en la temperatura de transición, de la misma manera que disminuye el máximo de Cp.

Gráfica 8-2. DSC de sistemas con pinocembrina de 0.16-0.36 mg/mL

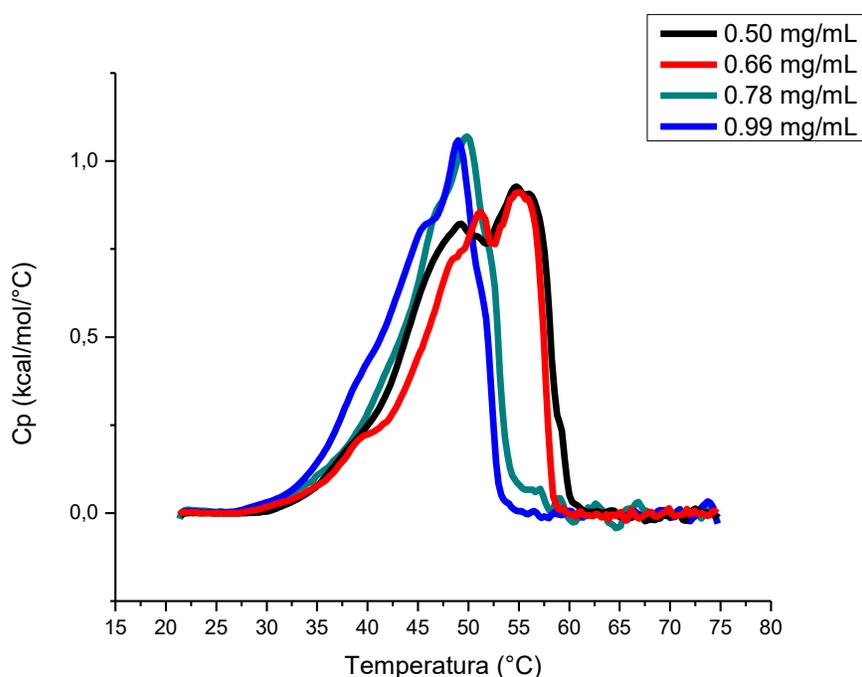


Estudios refieren que la magnitud del efecto inducido por un aditivo depende de su concentración (Jain & Wu, 1977), por lo tanto, las observaciones sobre el efecto de concentraciones bajas de pinocembrina en la transición de fase es consistente con su incorporación en la bicapa, es decir, a mayor cantidad de pinocembrina incorporada en la bicapa, mayor modificación del pico de transición se observa. Sin embargo, puesto que aún no existe saturación, la pinocembrina se distribuye homogéneamente y la forma de transición térmica se conserva debido a la interacción altamente cooperativa entre las moléculas de lípidos. La forma también es consistente con la explicación de que la bicapa modificada puede consistir en

un rango de fases que difieren solo ligeramente en sus características de empaque.

A partir de concentraciones 0.50 mg/mL hasta 0.99 mg/mL de pinocembrina se encuentran dos picos en la traza calorimétrica (Gráfica 8-3). Investigadores reportan que las diferencias cualitativas y cuantitativas en las características de transición surgen de una diferencia en la posición de localización de moléculas en diferentes regiones de la bicapa (Jain & Wu, 1977), por lo que se infiere que existe la presencia de dominios ricos y pobres en pinocembrina.

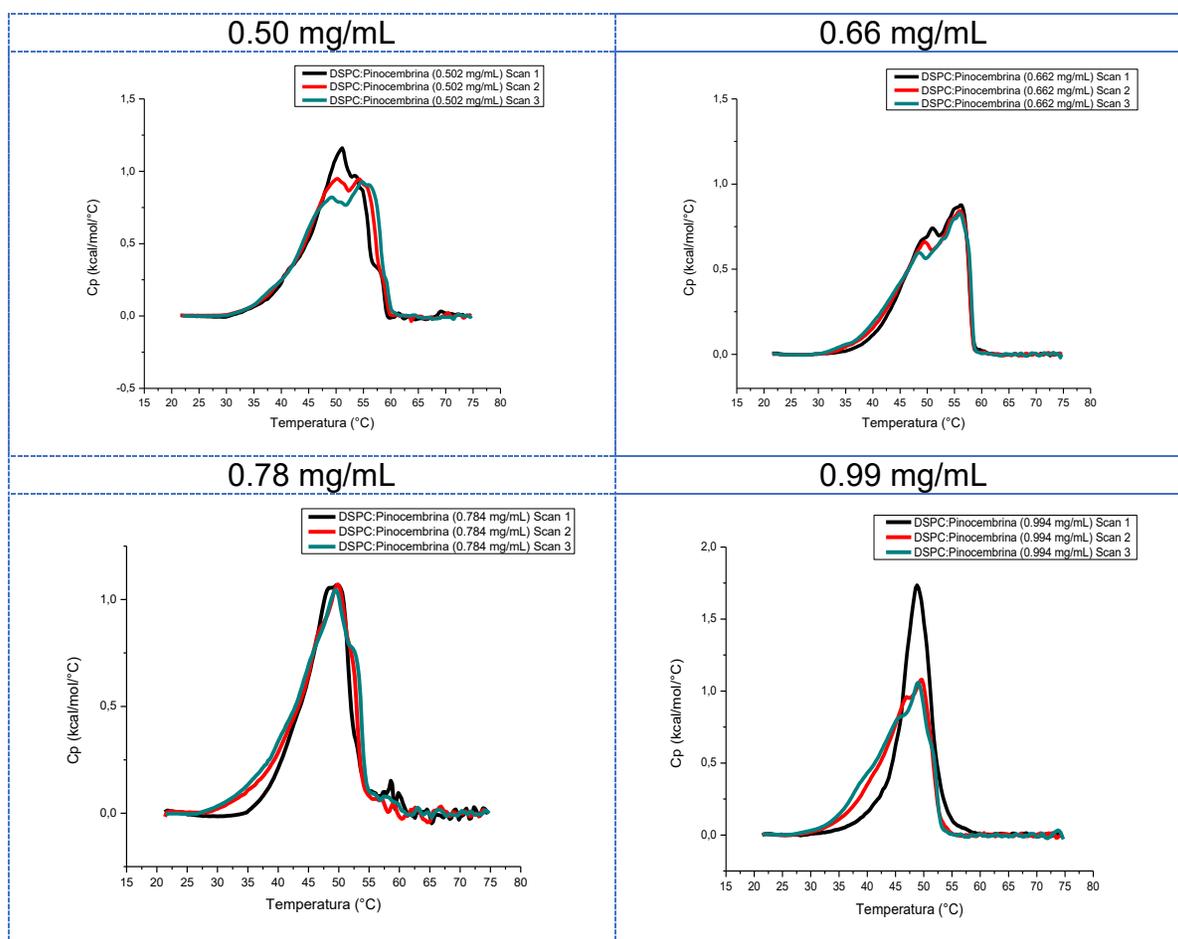
Gráfica 8-3. DSC de sistemas con pinocembrina de 0.50-0.99 mg/mL



Las propiedades de la nueva fase están indicadas por la forma y la posición del nuevo pico, sin embargo es preciso que se detalle su comportamiento mediante el análisis de los parámetros termodinámicos. De primera instancia se puede observar que conforme aumenta la concentración, la altura del pico 2 tiende a aumentar y el pico 2 se conserva, esto quiere decir que la presencia de pinocembrina se ve enriquecida en el dominio 2 mientras que el dominio 1 se conserva con la misma cantidad de pinocembrina.

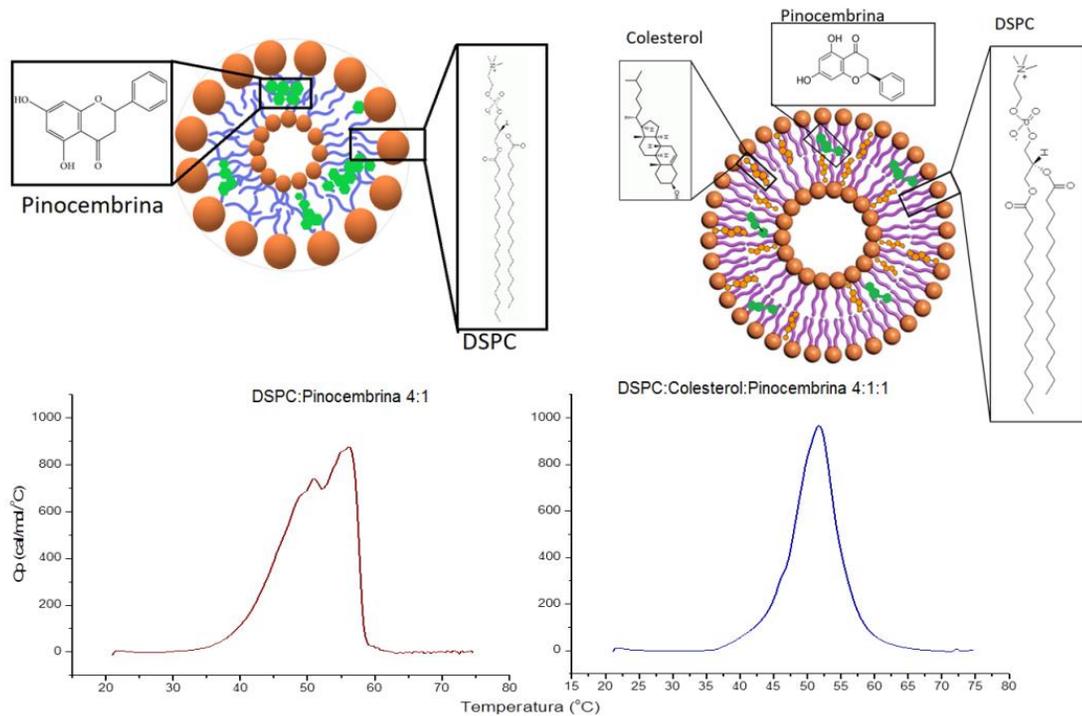
Está bien establecido que las dispersiones de lecitina en medio acuoso contienen casi exclusivamente estructuras de bicapas. Sin embargo, la conformación y el empaquetamiento de las moléculas de lípidos en la bicapa están sujetos a una reorganización significativa. Dichas transiciones pueden ser inducidas por un cambio en la temperatura y concentración del aditivo, como sucede en los termogramas obtenidos para concentraciones de pinocembrina donde se observa formación de dominios. Los liposomas sufren reacomodo de sus moléculas y se logra el equilibrio con la aplicación de energía térmica. Al observar los escaneos DSC de las gráficas presentadas en la Tabla 8-1, los sistemas de DSPC tienden a llegar al equilibrio a partir del escaneo número dos.

Tabla 8-1. DSC escaneos de DSPC:pinocembrina (0.50-0.99 mg/mL)



Cuando se incorporan en conjunto, pinocembrina y colesterol, el perfil termográfico que presenta el fosfolípido con la pinocembrina difiere, es decir, el colesterol evita la presencia de dominios (Figura 8-4) de pinocembrina en el liposoma y por lo tanto ya no se observan los picos asimétricos.

Figura 8-4. Efecto de la incorporación de colesterol en perfil termográfico de DSPC:pinocembrina

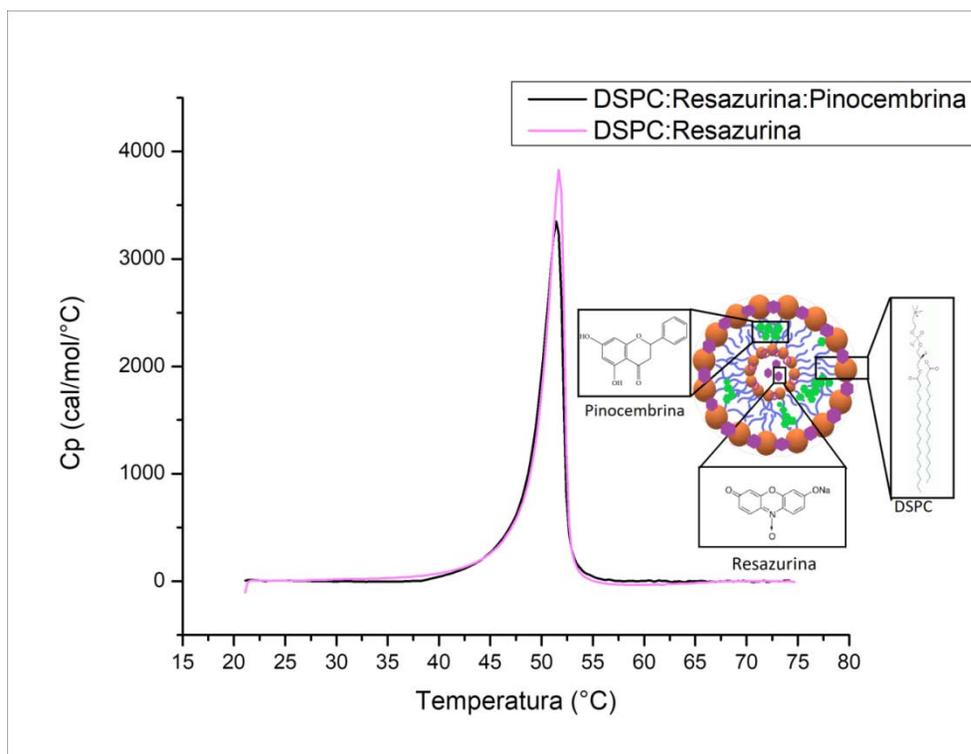


La literatura (M.-L. Briuglia, Rotella, McFarlane, & Lamprou, 2015) refiere que el colesterol es una molécula que incrementa el estado de orden de los fosfolípidos; éstos se encuentran ordenados y extendidos, permitiendo una distribución más uniforme de pinocembrina en la bicapa evitando la agregación.

En contraste, el comportamiento térmico de la pinocembrina no se ve afectado si se incorpora una molécula hidrofílica, como lo es resazurina; la forma del pico de transición principal de sistemas DSPC: pinocembrina no se ve afectada. Se confirma que la resazurina es incapaz de incorporarse dentro de las cadenas de acilo del liposoma, pero sí entre las cabezas de los fosfolípidos. En la Figura 8-5

se muestra la traza calorimétrica del sistema DSPC:pinocembrina:resazurina en donde se puede observar que el perfil térmico es característico de DSPC con cantidades bajas de pinocembrina. Por lo tanto, es posible incorporar moléculas de caracteres opuestos (hidrofóbicos e hidrofílicos) en un mismo liposoma sin que se altere la estabilidad térmica del sistema.

Figura 8-5. Influencia de resazurina en termograma de DSPC:pinocembrina



8.1.2 Parámetros termotrópicos

Asumiendo que el sistema se encuentra en equilibrio ($\Delta G = 0$), se puede calcular el parámetro ΔS mediante la Ecuación 4-8:

$$\text{Ecuación 4-8 } T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ} \therefore \Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T_m}$$

A continuación, en la Tabla 8-2 se muestran los parámetros obtenidos mediante DSC para cada sistema.

Tabla 8-2. Parámetros fisicoquímicos de los sistemas liposomales

Sistema	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta S(\text{kcal/mol}\cdot\text{K})$	$T_m (\text{°C})$	$T_{1/2}$
DSPC	1.11 ± 0.51	0.03 ± 0	53.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1
DSPC:colesterol 2:1	2.23 ± 0.06	0.02 ± 0	51.8 ± 0.3	13.0 ± 0.7
DSPC:colesterol 4:1	7.99 ± 0.03	0.03 ± 0	51.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1
DSPC:colesterol:pinocembrina 4:1:1	4.56 ± 0.76	0.04 ± 0	49.9 ± 1.9	16.1 ± 1.0
DSPC:colesterol:pinocembrina 4:2:1	9.30 ± 0.25	0.04 ± 0	49.3 ± 0.5	11.3 ± 0.3
DSPC: pinocembrina 4:1	10.27 ± 0.04	0.04 ± 0	55.9 ± 0.1	12.6 ± 0.6
DSPC:resazurina 4:1	13.95 ± 0.22	0.04 ± 0	53.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0
DSPC:pinocembrina:resazurina 8:1:1	11.62 ± 0.22	0.04 ± 0	51.6 ± 0.1	2.2 ± 0.0

Tabla 8-3. Parámetros fisicoquímicos obtenidos por DSC de DSPC: pinocembrina a diferentes concentraciones

Pinocembrina (mg/mL)	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{kcal/mol}\cdot\text{K})$	$T_m (\text{°C})$	$T_{1/2}$
Pico único en la transición				
0	10.74 ± 0.12	0.03 ± 0	53.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2
0.16	12.27 ± 0.01	0.04 ± 0	52.9 ± 0.0	3.3 ± 0.4
0.236	12.41 ± 0.22	0.04 ± 0	52.7 ± 0.1	3.5 ± 0.2
0.358	11.33 ± 0.13	0.04 ± 0	51.9 ± 0.1	4.2 ± 0.5
Dos picos en la transición				
0.502	13.72 ± 0.26	0.04 ± 0	52.0 ± 2.4	12.9 ± 2.2
0.662	10.27 ± 0	0.03 ± 0	55.9 ± 0.1	12.6 ± 0.6
0.784	10.61 ± 0.95	0.03 ± 0	49.7 ± 0.2	9.2 ± 1.2
0.99	11.07 ± 0.55	0.03 ± 0	49.2 ± 0.4	8.0 ± 2.5

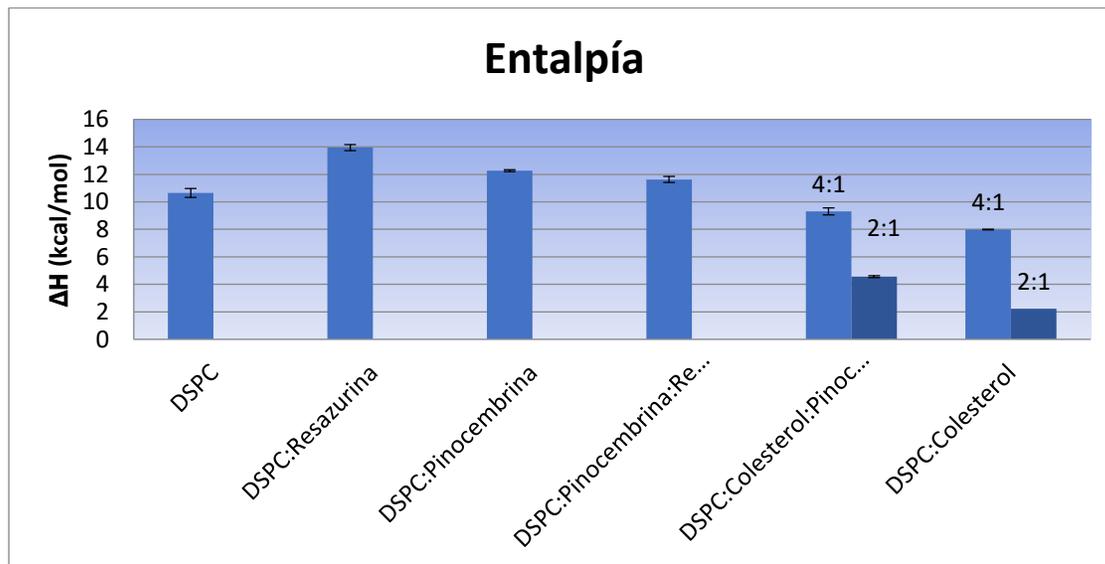
Tabla 8-4. Parámetros fisicoquímicos obtenidos por DSC utilizando deconvolución de picos para DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL

Pinocebrina (mg/mL)	ΔH_1 (kcal/mol)	ΔH_2 (kcal/mol)	ΔS_1 (kcal/mol K)	ΔS_2 (kcal/mol K)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	$T_{1/21}$ (°C)	$T_{1/22}$ (°C)
0.50	11.35 ±0.34	2.53 ±0.55	0.04±0	0.01±0	48.9 ±0.3	55.5 ±0.5	10.6 ±0.4	3.7 ±0.2
0.66	7.89 ±0.14	2.68 ±0.24	0.02±0	0.01±0	48.8 ±0.6	55.6 ±0.1	10.7 ±0.8	3.5 ±0.3
0.78	6.17 ±0.61	4.53 ±0.53	0.02±0	0.01±0	44.8 ±0.8	49.9 ±0.1	9.5 ±0.5	4.8 ±0.2
0.99	7.04 ±0.56	3.79 ±0.29	0.02±0	0.02±0	43.9 ±0.4	49.1 ±0.02	8.9 ±0.5	4.2 ±0.1

En los párrafos siguientes se desglosará a mayor detalle cada propiedad termodinámica.

Entalpía

Gráfica 8-4. Entalpía de sistemas liposomales



La Gráfica 8-4 muestra los valores de entalpía de cada sistema, la primera barra representa el control (DSPC puro) y los siguientes sistemas se encuentran ordenados de mayor a menor.

Observe que aquellos sistemas que contienen colesterol, tienen los valores más bajos de entalpía. Contrario a lo que sucede con fosfolípidos de cadena corta (McMullen et al., 1993), el colesterol presenta un desequilibrio hidrofóbico con las cadenas de acilo de los fosfolípidos de DSPC por la longitud que poseen; se rompen interacciones de Van der Waals entre las cadenas pero se forman nuevas interacciones con el colesterol, que necesitan menor energía para romperse, comparado con el fosfolípido puro. Cantidades de 20% y 33% mol influyen directamente en el empaquetamiento de la bicapa; ya que una proporción creciente de moléculas de fosfolípidos interactuaría con más de una molécula de colesterol en lugar de con las cadenas de hidrocarburos de los fosfolípidos adyacentes, es decir, entre mayor número de moléculas de colesterol se incorporen, más espacio habrá entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos provocando estas interacciones sean más débiles.

Sorprendentemente, los sistemas con resazurina presentan los valores más altos de entalpía. Como se mencionó anteriormente, la resazurina tiene interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos y posiblemente se intercale entre las cabezas de los fosfolípidos. La literatura refiere que moléculas hidrofílicas dentro de un liposomas pueden inducir un arreglo molecular tipo cristal (T. Li, Cipolla, Rades, & Boyd, 2018), por lo cual es necesario suministrar más energía para romper las interacciones electrostáticas formadas.

Cuando se encuentran en conjunto las moléculas resazurina y pinocembrina, se disminuye el valor de entalpía; esto es ocasionado porque a pesar de que se encuentran en compartimientos diferentes (resazurina en el núcleo del liposoma y entre las cabezas polares del liposoma; pinocembrina entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos), no se induce el mismo el ordenamiento molecular que proporciona cada uno por separado, por tanto el empaquetamiento se verá reducido y provocará la disminución de ΔH .

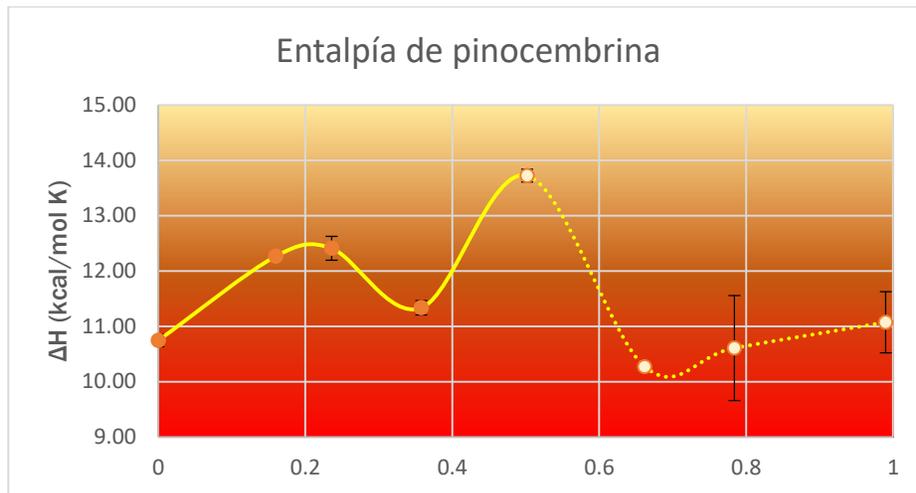
Los sistemas DPSC:colesterol:pinocembrina relación molar 4:1 y 2:1 tienen los menores valores de entalpía. El coeficiente de partición (Log P) es un valor que indica la afinidad de un compuesto por la fase acuosa u oleosa; puesto que

pinocembrina y colesterol son moléculas hidrofóbicas, aquella con mayor valor de Log P es la molécula más lipofílica, en este caso colesterol (Log P ~ 7.17) (Bhardwaj & Burgess, 2010); en consecuencia, será preferentemente incorporada en la bicapa, dominando el comportamiento del colesterol y resultando en un valor menor de entalpía por la fluidización de la bicapa.

En contraste, en el sistema que únicamente contiene pinocembrina relación molar 4:1 (DSPC:pinocembrina), se observa un aumento en el valor de entalpía con respecto al lípido puro porque la molécula le confiere mayor organización a la bicapa. Si se analiza la estructura de la pinocembrina, se encuentra un centro estereogénico único; estudios reportan que moléculas que contienen tal centro presentan rigidez estructural (X.-C. Li, Ferreira, & Ding, 2010) y por tanto, reduce el movimiento de las cadenas de los fosfolípidos, ocasionando que éstas tengan mayores interacciones entre ellas, necesiándose mayor energía para romper las fuerzas de Van der Waals.

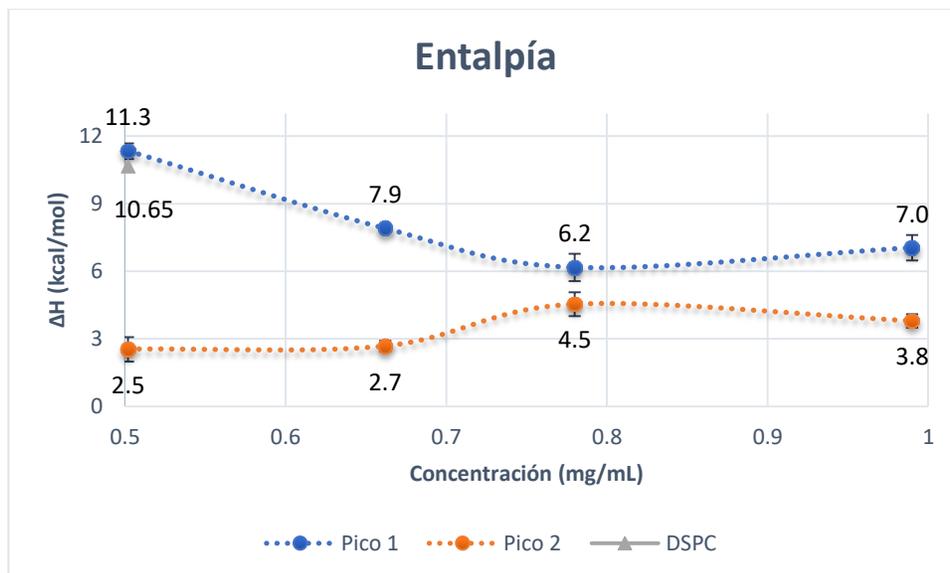
Observe el comportamiento de entalpía que presenta pinocembrina a concentraciones bajas en la Gráfica 8-5 (línea punteada representa la formación de dominios). Hasta 0.24 mg/mL se puede suponer que la pinocembrina confiere al liposoma cierta rigidez estructural, producto de la reducción del movimiento de las cadenas de acilo, necesiándose cada vez mayor energía para romper los enlaces entre ellas, que se ve reflejado en un aumento de entalpía. Sin embargo, si se sigue aumentando la concentración, estos valores ya no aumentan debido a que el lípido tiene una cadena larga de acilo y la pinocembrina es capaz de intercalarse por todo el largo de ella. La literatura refiere que los últimos carbonos de la cadena se encuentran ligeramente desordenados, por lo que la incorporación de otra molécula en esos carbonos no afectaría significativamente el valor de entalpía.

Gráfica 8-5. Entalpía de DSPC:pinocembrina a diferentes concentraciones



Dicho lo anterior, concentraciones a partir de 0.50 mg/mL formación de dominios, el sistema tiende a valores de entalpía similares a los que se presenta con el fosfolípido puro. Si se analizan los datos de deconvolución, se observa en la Gráfica 8-6 que hay una tendencia a disminuir la entalpía de un pico.

Gráfica 8-6. Entalpía de cada pico obtenida por deconvolución en los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL

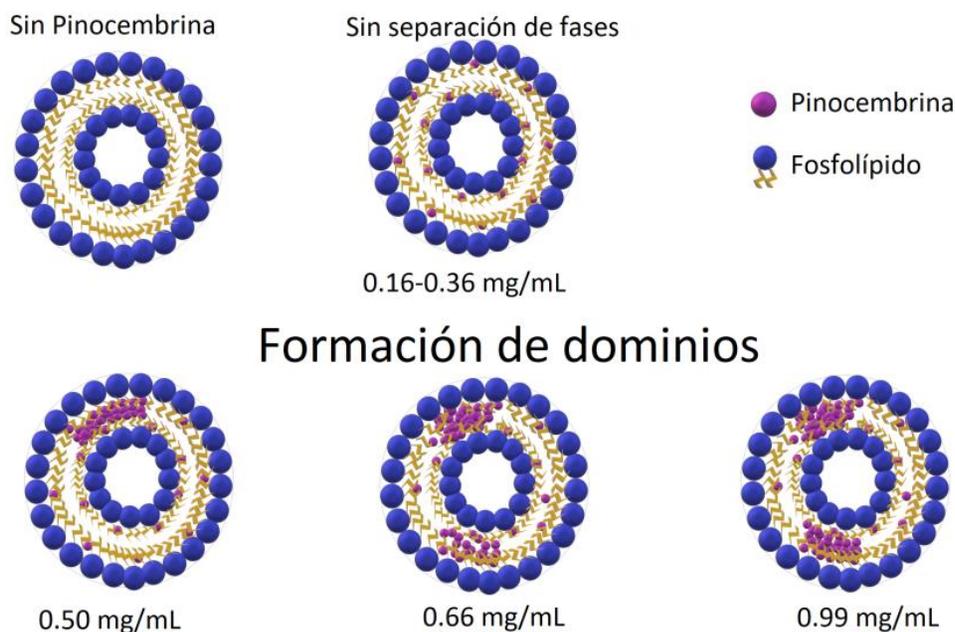


Al inicio de la formación de agregados, en el pico 1 (rico en pinocembrina) se abaten las fuerzas hidrofóbicas entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos

porque se encuentran saturadas por la gran cantidad de moléculas de pinocembrina presentes y el valor de entalpía disminuye. Puesto que esa región del liposoma se encuentra ya saturada, las moléculas de pinocembrina se empiezan a distribuir en el segundo dominio (pico 2), y se observa el mismo comportamiento que se observa a concentraciones bajas (Gráfica 8-6), es decir, la pinocembrina induce una rigidez estructural en el dominio 2 y por tanto aumentan los valores de entalpía hasta un máximo de concentración (0.78 mg/mL), posterior a esto, presentará el mismo comportamiento del dominio 1 debido a la saturación de pinocembrina que ocasiona la disminución de los valores de entalpía.

En la Figura 8-6 se representa el comportamiento de pinocembrina en la bicapa de liposomas. A concentraciones bajas (0.16 a 0.36 mg/mL), se distribuye homogéneamente entre los fosfolípidos. A partir de concentraciones de 0.50 mg/mL se forman dominios ricos y pobres en pinocembrina.

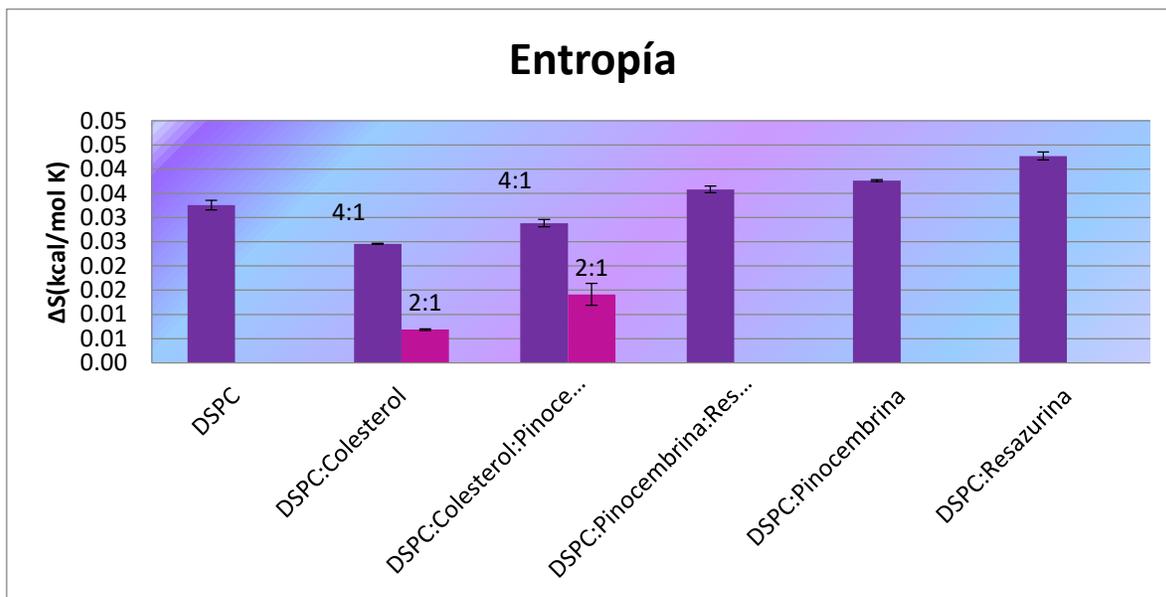
Figura 8-6. Comportamiento de pinocembrina a diferentes concentraciones dentro del liposoma



Entropía

Desde otra perspectiva, se sabe que el valor de ΔS da un valor cuantitativo del cambio en el orden del sistema (Ikonen, Murtoimäki, & Kontturi, 2010). La gráfica de entropía (Gráfica 8-7) sigue un orden creciente para ser comparados con el control (DSPC) que se encuentra en la primera barra.

Gráfica 8-7. Valores de entropía de sistemas liposomales



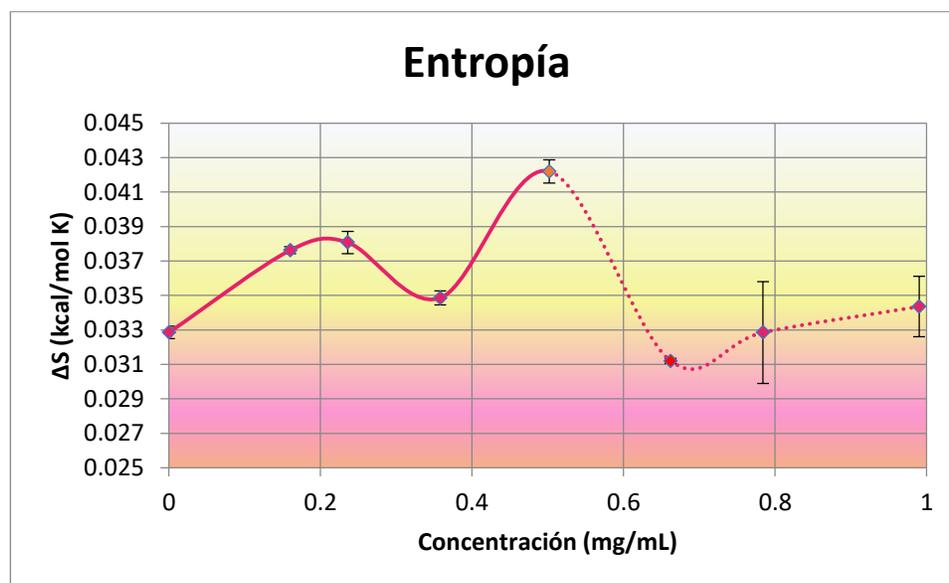
Si bien se observó que los sistemas liposomales con colesterol reducen las interacciones hidrofóbicas entre fosfolípidos, ésta molécula produce los valores más bajos de entropía, indicando que el colesterol es capaz de inducir orden, comportamiento que concuerda con la literatura que refiere que la gran proximidad del sistema de anillo del esterol plana del colesterol ordena las cadenas de hidrocarburos de los fosfolípidos y disminuye la isomerización trans-Gauche sobre enlaces C-C (Ohvo-Rekila, 2002).

Los valores más altos de entropía se obtienen en el sistema DSPC:resazurina debido al trastorno producido en el núcleo hidrofílico del liposoma que al intercalarse con las cabezas de grupo de los lípidos ocasiona un desacomodo de la bicapa, que puede alargarse o deformarse para tratar de acomodar el complejo formado (T. Li et al., 2018).

El aumento del valor de entropía en sistemas DSPC: pinocembrina y DSPC: pinocembrina: resazurina, respecto al lípido puro, indican que la pinocembrina causa una interacción menos estabilizadora con los fosfolípidos debido al impedimento estérico que producen los sustituyentes de la molécula, que suprimen la formación de disposiciones ordenadas en los fosfolípidos de los liposomas.

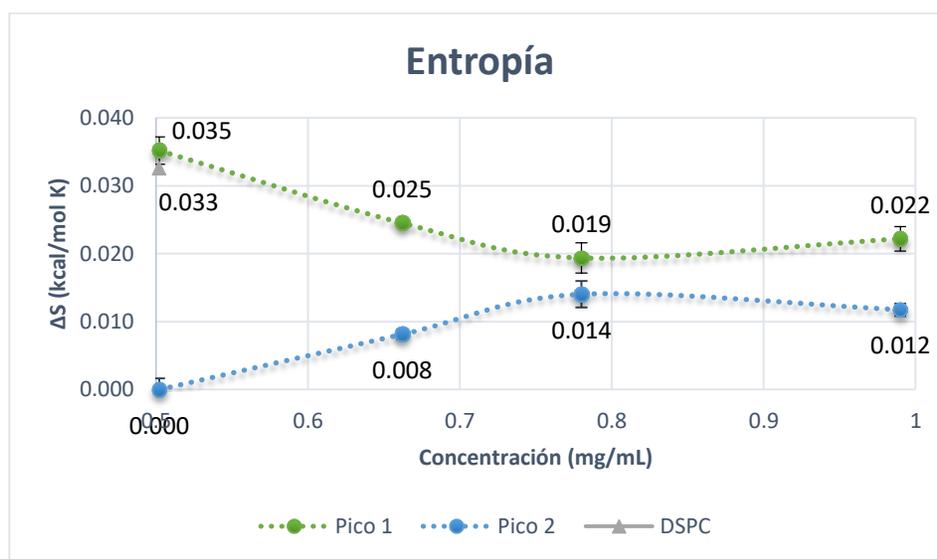
Para analizar únicamente el cambio de entropía de pinocembrina, la Gráfica 8-8 muestra a distintas concentraciones de pinocembrina. La pinocembrina es un agente caotrópico donde el desorden inducido del sistema depende de su concentración. Si se compara con el fosfolípido puro, la inclusión de pinocembrina, a bajas concentraciones, aumenta el valor de entropía, insertándose entre los primeros carbonos de las cadenas de acilo de los fosfolípidos y por consiguiente induce un desorden ente ellos. Con éste parámetro se confirma también, que el cambio de entropía a concentraciones crecientes (de 0.3 mg/mL) no se ve afectado puesto que más moléculas de pinocembrina son capaz de distribuirse a lo largo de las cadenas de acilo, insertándose entre los últimos carbonos, que en antes de la transición ya se encontraban ligeramente desordenados.

Gráfica 8-8. Entropía de DSPC: pinocembrina a diferentes concentraciones



Respecto a la formación de dominios de pinocembrina (Gráfica 8-9) el valor de entropía correspondiente al pico 1 es el mayor obtenido, esto quiere decir que la pinocembrina inicialmente se acomoda en el pico 1 e induce desorden. Conforme se empiezan a incorporar más moléculas de pinocembrina, la entropía decrece para el pico 1, debido a la formación de estructuras tipo cristal (Elizalde Domínguez, 2018). Posteriormente, la entropía crece en el pico 2, porque las moléculas de pinocembrina tienden a acumularse en un segundo dominio y crean desorden en él. En otras palabras, pocas moléculas de pinocembrina (distribuidas homogéneamente en la bicapa o formando dominios) crean desorden, mientras que cantidades mayores, forman estructuras tipo cristal que inducen orden.

Gráfica 8-9. Entropía de cada pico obtenido por deconvolución en los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL



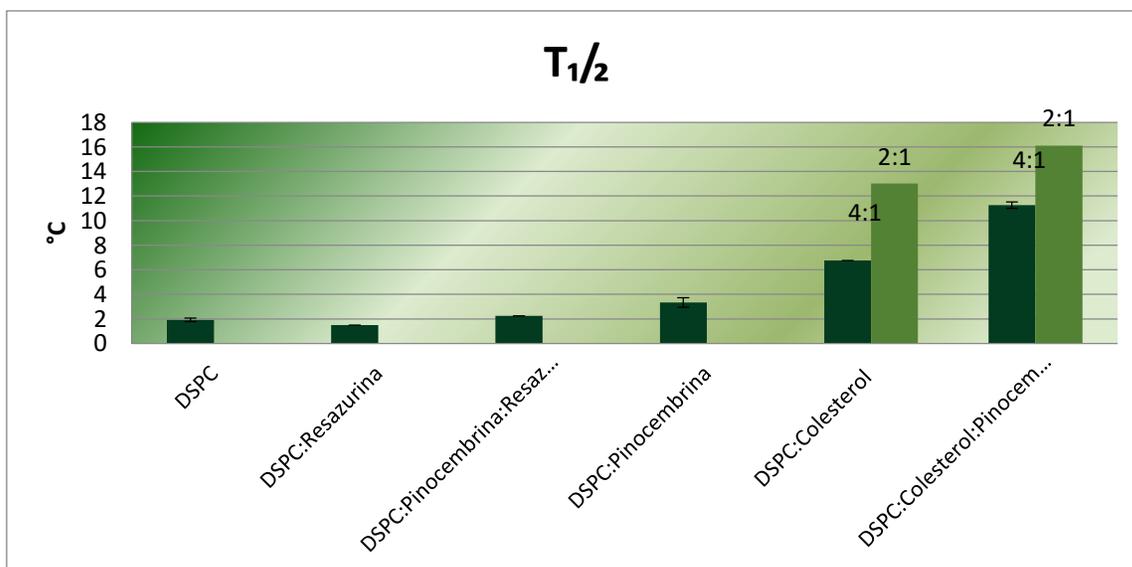
Cooperatividad molecular

El valor de $T_{1/2}$ puede usarse como una medida que es muy sensible a la presencia de cualquier aditivo. Los resultados corresponden a lo esperado, esto es, aquellos sistemas que posean más componentes incorporados en la membrana del fosfolípido, poseen un valor de $T_{1/2}$ mayor (Gráfica 8-10). En cambio, el sistema DSPC que incluye a la molécula hidrofílica tiene el valor más cercano al fosfolípido puro, pues obedece el supuesto de que la molécula no se

intercala en la membrana lipídica y por lo tanto, no tiene influencia en éste parámetro.

También, se considera que el valor de $T_{1/2}$ es el inverso de la cooperatividad molecular. Los picos más amplios, y con ello valores más grandes de $T_{1/2}$, corresponden a transiciones de fase menos cooperativas (S. M. Ohline, M. L. Campbell, M. T. Turnbull, 2000).

Gráfica 8-10. Valores de $T_{1/2}$ de los sistemas en orden descendente

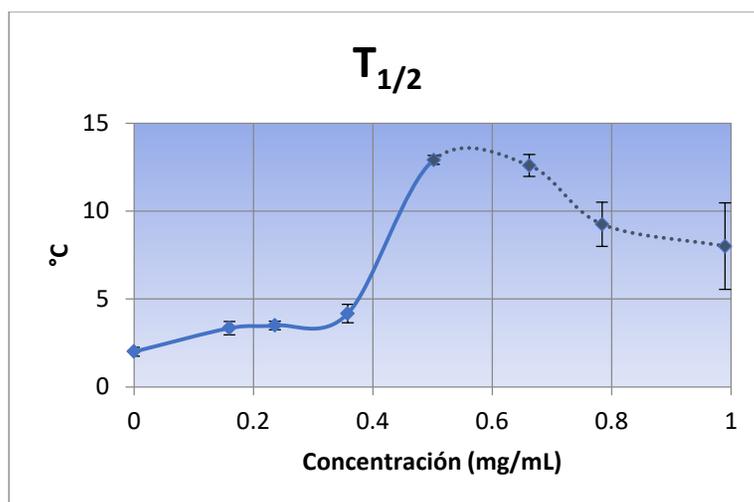


Con este parámetro se obtiene que uno de los sistemas menos cooperativos es aquel que contiene colesterol y pinocembrina. Se ha reportado que la inclusión de colesterol puede formar dominios o agregados en el plano de la membrana y por consecuente se reduce la cooperatividad molecular. (Ohvo-Rekila, 2002). Por otro lado, se obtiene que con 33% mol de colesterol, la membrana no se satura, pues ésta cantidad sigue incorporándose en la bicapa y por esta razón tales sistemas corresponden a los valores más altos de $T_{1/2}$.

Por otra parte, el sistema que mayor valor de $T_{1/2}$ posee es DSPC: pinocembrina. Si analizamos la tendencia de los valores de $T_{1/2}$ con diferentes concentraciones de pinocembrina en la Gráfica 8-11, se encuentra que conforme aumenta la concentración de pinocembrina, aumenta el valor de $T_{1/2}$. La pinocembrina se

distribuye relativamente homogénea a concentraciones bajas dentro de la bicapa, hasta que llega a un máximo correspondiente a la aparición de 2 picos; es decir, la formación de agregados de pinocembrina en ciertas regiones de la membrana del liposoma. De esta manera se comprueba que la pinocembrina forma estados intermedios durante la transición.

Gráfica 8-11. Valores de $T_{1/2}$ de DSPC:pinocembrina a diferentes concentraciones

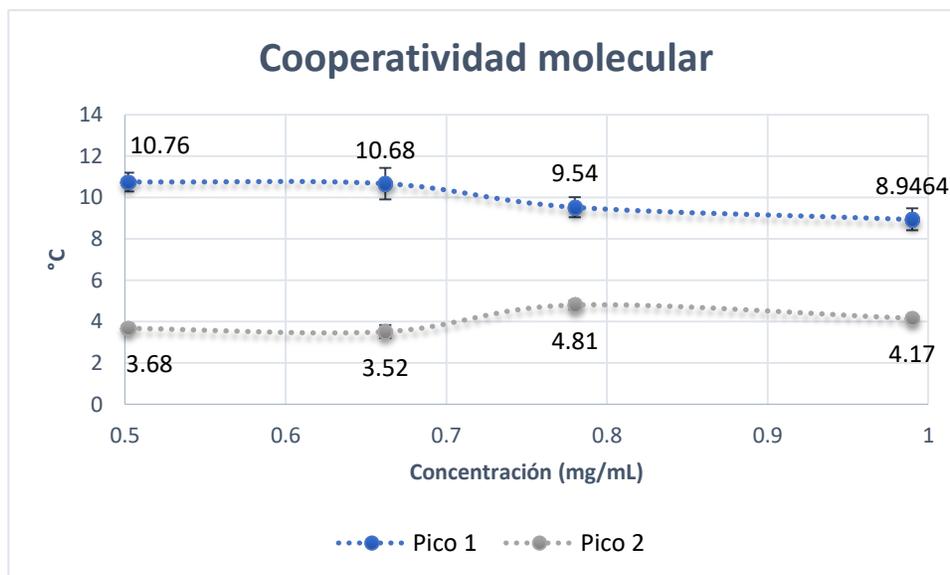


Para comprender éste fenómeno se puede describir como que en una bicapa, en fase de gel, el movimiento en una cadena de ácido graso se transmite en cierta medida a las cadenas adyacentes, y así sucesivamente a varias moléculas que forman una unidad cooperativa (Jain & Wu, 1977). Por lo tanto, los cambios conformacionales se pueden transmitir a una parte sustancial de la unidad cooperativa. Sin embargo, la pinocembrina bloquea este sistema transmisor, de modo que el movimiento cooperativo de las cadenas se amortigua rápidamente, ocasionando que los cambios en la membrana permanezcan relativamente locales en lugar de involucrar a la unidad cooperativa como un todo.

En la Gráfica 8-12, correspondiente a concentraciones de pinocembrina que presentan formación de dominios, es posible confirmar la hipótesis de que las moléculas de pinocembrina en el pico 1 (rico en pinocembrina) ya no se siguen agregando en el primer dominio formado inicialmente, pues el valor de $T_{1/2}$ tiene valores similares. Por el contrario, el pico 2 aumenta su valor hasta un máximo,

indicando que la pinocembrina se incorpora en un segundo dominio y a lo largo de las cadenas de fosfolípidos.

Gráfica 8-12. Valores de $T_{1/2}$ de los picos obtenidos por deconvolución en los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL



Temperatura de transición

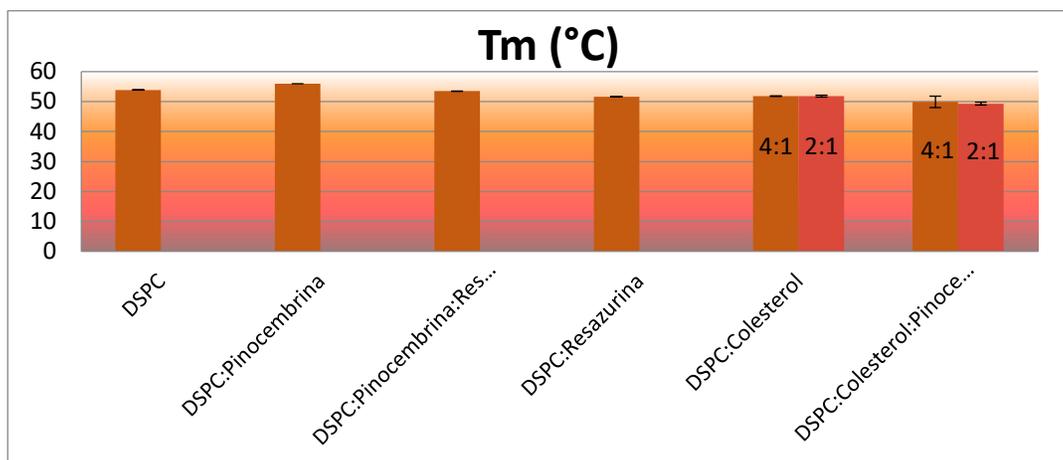
Para poder comprender la modificación de la fluidez de la bicapa con la presencia de aditivos es necesario analizar los valores de T_m . La transición principal surge de la fusión de cadenas; por lo tanto, por encima de la temperatura de transición, la isomerización rotacional trans / Gauche a lo largo de las cadenas se expande y disminuye lateralmente el grosor de la bicapa. Por lo tanto, los lípidos se vuelven más fluidos (fase cristalina líquida). Si T_m se desplaza a valores menores, significa que los aditivos fluidizan la bicapa del liposoma, por el contrario si se desplazan a valores mayores, los aditivos gelifican la bicapa.

En este estudio, la Gráfica 8-13 muestra que casi todos los aditivos son capaces de fluidizar la bicapa; a excepción del liposoma que contiene pinocembrina relación molar 4:1.

El colesterol abate la temperatura de transición ya que penetra en la bicapa debido a interacciones hidrofóbicas, perturbándola y ocasionando un mayor número de

confórmeros Gauche y por consiguiente, aumenta la fluidez. Es importante resaltar que la fluidez de la bicapa es similar con cantidades de 25% y 33% de colesterol, ya que a esas relaciones molares, la bicapa ya se encuentra totalmente fluidizada.

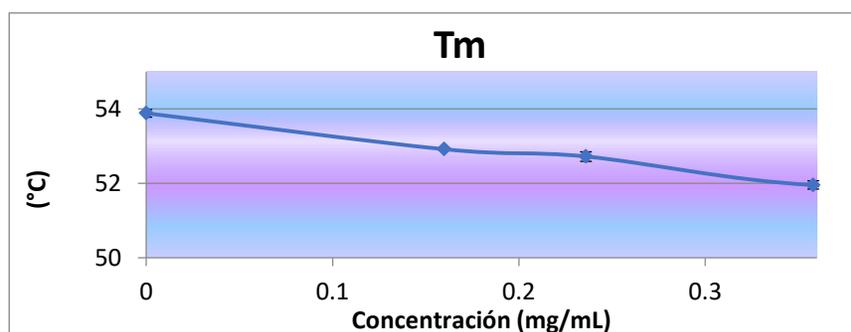
Gráfica 8-13. Valores de Tm de los sistemas liposomales



Por el contrario DSPC:pinocembrina (0.6 mg/mL) es el único sistema que gelifica la membrana. Sin embargo, es necesario observar el comportamiento que presenta con diferentes concentraciones.

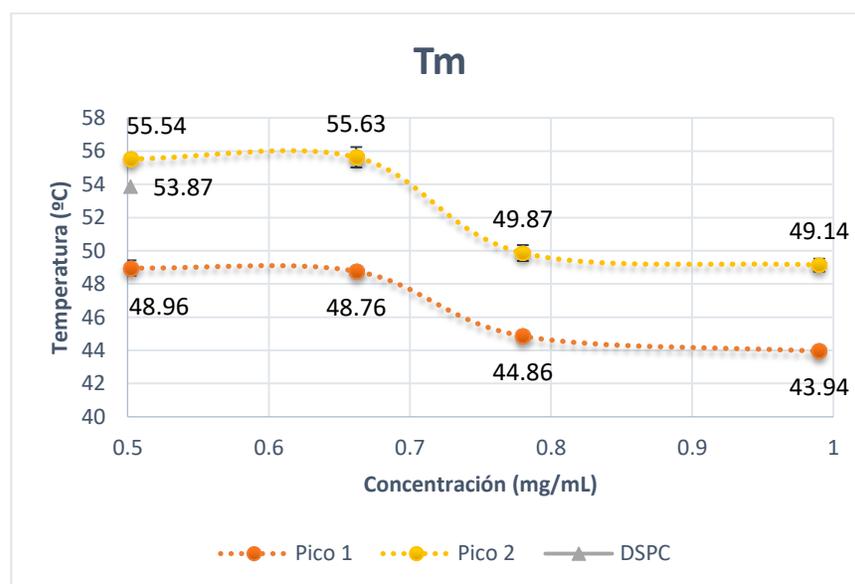
Es evidente que el valor de Tm es inversamente proporcional a concentraciones bajas de pinocembrina (Gráfica 8-14). La presencia de pinocembrina ocasiona una fluidización de la bicapa, es decir, se favorece el estado líquido cristalino en el liposoma. Sin embargo, este comportamiento se ve modificado a partir de la formación de dominios.

Gráfica 8-14. Temperatura de transición de DSPC:pinocembrina a diferentes concentraciones



Observe en la Gráfica 8-15 que corresponde a los valores de Tm en donde existe formación de dominios de pinocembrina. Presenta un comportamiento donde los valores de Tm disminuyen de manera no lineal, de hecho la formación de 2 picos, ocasiona el aumento de valor de Tm con respecto al fosfolípido puro (53.87 °C), presentándose un arreglo molecular más estructurado que induce en el pico 1 una rigidización de la membrana en el dominio con mayor cantidad de pinocembrina. Mientras tanto, el dominio que es pobre en pinocembrina, presenta mayor fluidez ocasionado por la formación de confórmeros Gauche que favorecen el estado líquido cristalino del liposoma; siendo esta tendencia la misma que se observó cuando había poca cantidad de pinocembrina en el liposoma.

Gráfica 8-15. Temperatura de transición de cada pico obtenido por deconvolución de los sistemas DSPC: pinocembrina 0.50-0.99 mg/mL



8.2 Estabilidad en disolución de la bicapa de liposomas

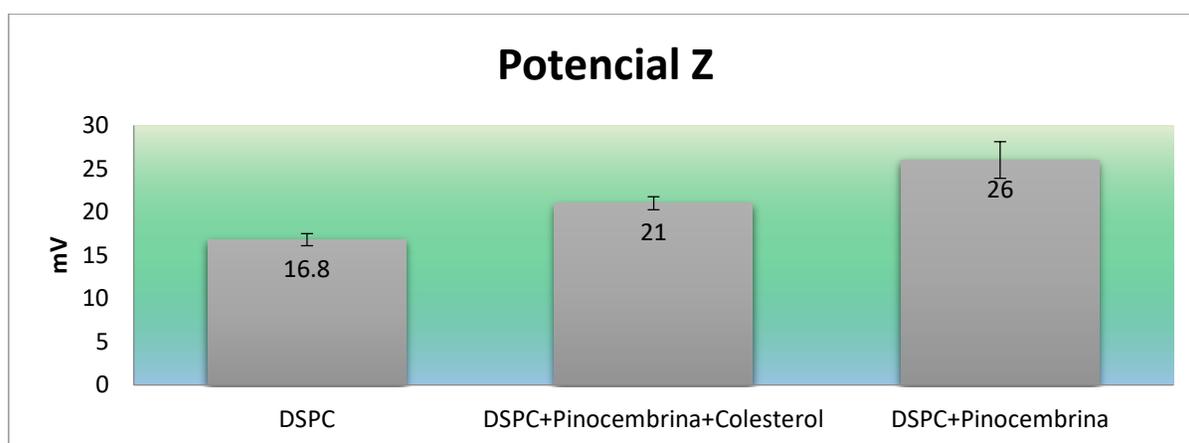
Los resultados obtenidos de los sistemas se encuentren entre $|15|$ y $|30|$ mV. Si se considera como óptimos aquellos mayores a $|60|$ mV (Heurtault, Saulnier, Pech, Proust, & Benoit, 2003), se deduce que los sistemas son relativamente estables, en tanto, los resultados son considerados como aceptables.

Como se muestra en la Gráfica 8-16, los valores de potencial Z obtenidos para los sistemas son positivos, por lo que se infiere que la estructura de los grupos

polares de los liposomas se encuentra con el grupo colina por encima del plano del grupo fosfato.

Estudios refieren que valores de potencial Z de liposomas pueden cambiar debido a modificaciones en la orientación de los grupos de cabeza de los lípidos; el valor potencial es negativo cuando el plano del grupo colina del fosfolípido se encuentra debajo del plano del grupo fosfato y positivo en el caso opuesto (Fatouros & Antimisiaris, 2002).

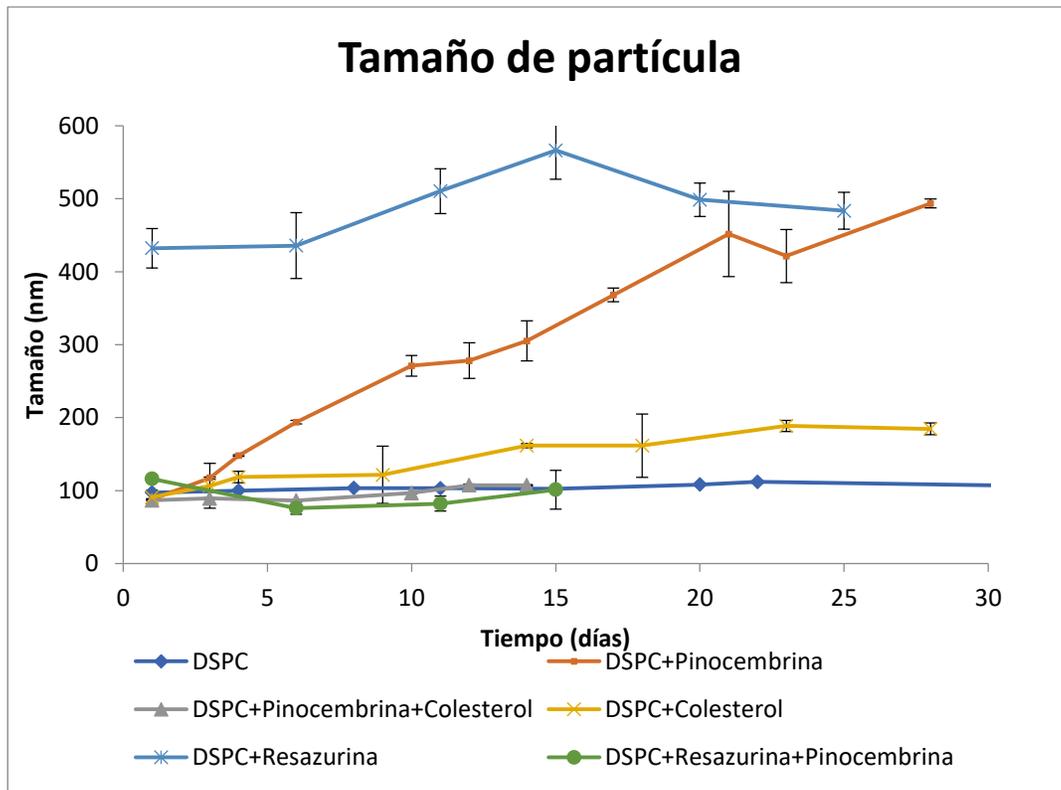
Gráfica 8-16. Valores de potencial Z de sistemas de DSPC



Lo más importante de resaltar de estos resultados es que no es conveniente añadir colesterol a los sistemas con pinocembrina en la preparación de liposomas puesto que la pinocembrina por sí sola aumenta la estabilidad.

Para conocer el tiempo de floculación de los sistemas en disolución y predecir su tendencia a agregarse, es necesario analizar los tamaños de partícula en función del tiempo (Gráfica 8-17). El tamaño de los liposomas fue medido por DLS hasta el día 60 para DSPC puro y hasta el día 30 para los demás sistemas que no presentaban floculación visible.

Gráfica 8-17. Tamaño de partícula de liposomas de DSPC



El sistema que contiene resazurina presenta un mayor tamaño, porque como se había mencionado antes, se intercala entre las cabezas polares de los liposomas, ocasionando un aumento considerable de su tamaño. Además, el movimiento browniano y el choque entre las partículas, ocasionan que éstos floculen. En general, el origen de la agregación de los liposomas es la atracción de van der Waals. (Heurtault et al., 2003).

El sistema que tiende a floccular más rápido es el que contiene pinocembrina y colesterol (día 12), esto sucede porque la formación de los liposomas pequeños requirió la entrada de energía considerable y creó un estado de empaquetamiento termodinámicamente desfavorable. La flocculación fue un mecanismo para disipar el exceso de energía superficial que se originaba a partir del empaquetamiento molecular distorsionado. Es importante resaltar que a pesar de que flocculan en menor tiempo, los sistemas no cambian de tamaño considerablemente.

Cuando se agrega sólo colesterol el tamaño se mantiene a través del tiempo y el sistema presenta estabilidad. Algunos estudios han reportado que el colesterol es capaz de reducir la permeabilidad del liposoma del agua (Castile & Taylor, 1999). La desestabilización de vesículas en la interfase aire/agua se ha utilizado como una herramienta para estudiar el comportamiento de la membrana; si no existe permeabilidad, no existe deformación de la superficie del liposoma, consecuentemente el liposoma conserva por mayor tiempo su forma y tamaño, y no tenderá a agregarse.

El sistema DSPC:pinocembrina también presenta estabilidad y el resultado concuerda con el valor de potencial Z, pues su valor es el mayor (26 mV). A pesar de que su tamaño incrementa más rápido sistema, el sistema no flocula tan rápido, puesto que los liposomas se fusionan y la fusión corresponde a la formación de nuevas estructuras coloidales de mayor tamaño correspondiente a la reorganización de la membrana con la reubicación de moléculas de lípidos individuales entre las capas de lípidos adyacentes (Heurtault et al., 2003).

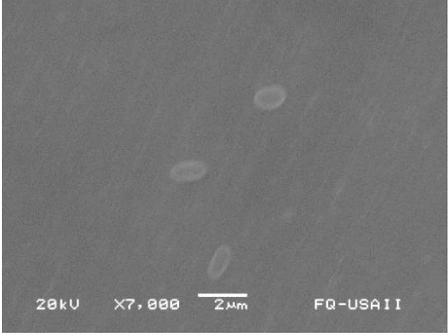
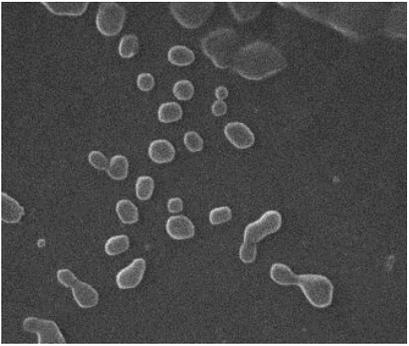
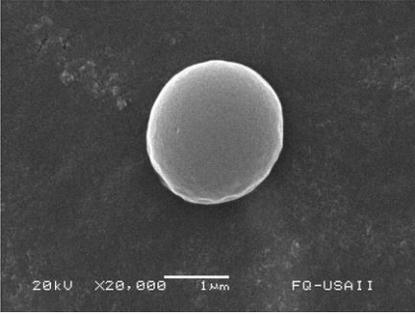
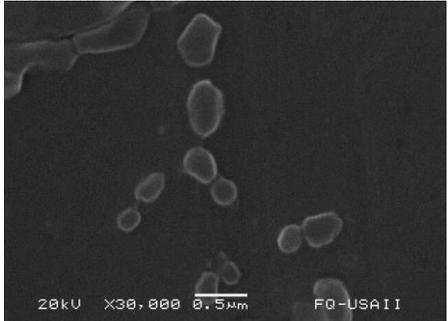
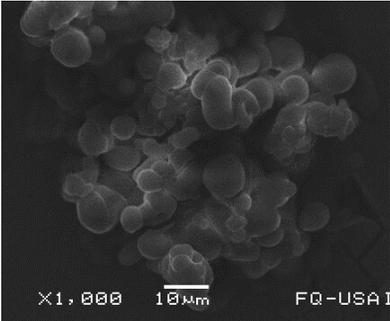
Por otra parte, al día 15 se presenta precipitación en la suspensión liposomal DSPC: pinocembrina: resazurina (formación de partículas sólidas doradas). La precipitación en liposomas se ha observado en otros estudios que incorporan moléculas hidrofílicas, como resultado de la formación de partículas amorfas o nanocristales. De forma sorprendente, esta característica no se presenta en sistemas DSPC:pinocembrina ni DSPC:resazurina, lo que sugiere que la formación de las nuevas estructuras coloidales se induce por algún tipo de interacción entre pinocembrina y resazurina, donde puede influir de diversas variables físicas o químicas.

Desde una perspectiva biofísica lipídica, el precipitado cristalino que se forma dentro de los liposomas (con algunas moléculas, como Resazurina) es intrigante desde una perspectiva de, ya que puede estirar o deformar la bicapa y proporcionar un medio adicional para controlar la velocidad de liberación del fármaco. Es decir, el complejo recién formado podría alterar la solubilidad de las moléculas y, por lo tanto, el perfil de liberación.

8.3 Morfología de liposomas de DSPC

Si se compara la morfología de los liposomas elaborados (ver las micrográficas obtenidas por microscopía de barrido mostradas en la Tabla 8-5), se observa que casi todos los liposomas presentan una morfología tubular. Estudios refieren que la fuerza impulsora de esas transformaciones es la presión osmótica, que disminuye el volumen del liposoma y deforma la superficie (Hotani et al., 2003).

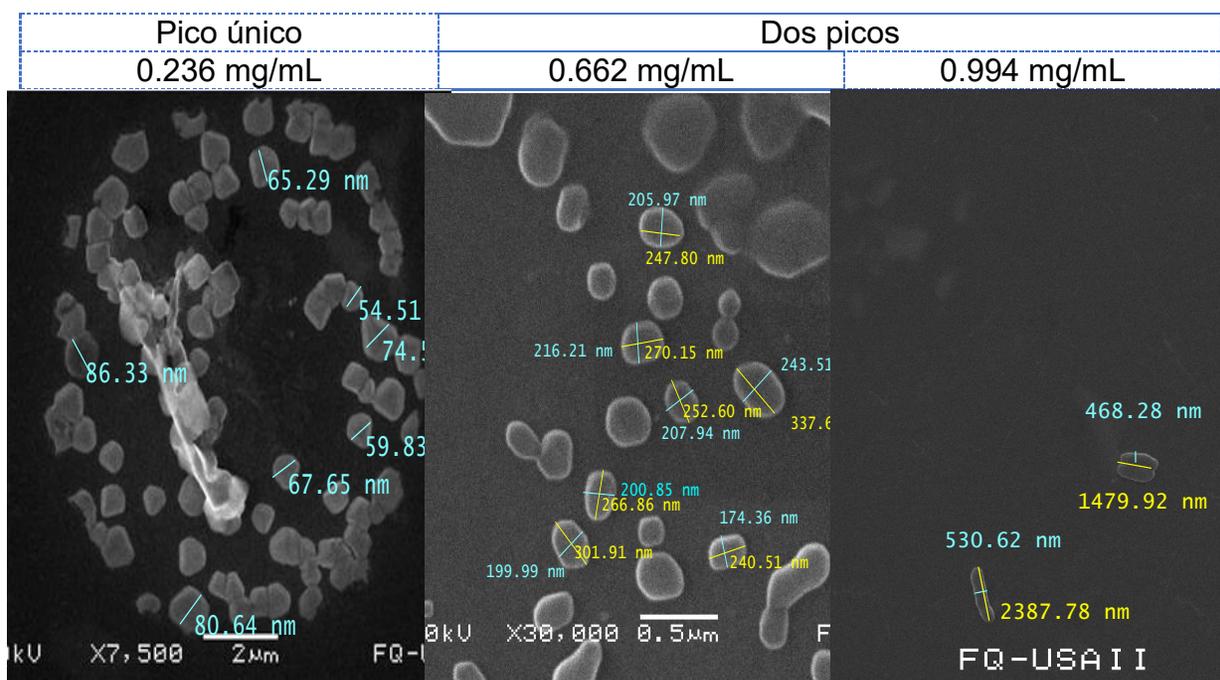
Tabla 8-5. Morfología de liposomas obtenidas por SEM

<p>DSPC</p>  <p>20kV X7,000 2µm FQ-USAI I</p>	<p>DSPC:pinocembrina</p> 
<p>DSPC:colesterol</p> 	<p>DSPC:colesterol: pinocembrina</p>  <p>20kV X20,000 1µm FQ-USAI I</p>
<p>DSPC:resazurina</p>  <p>20kV X30,000 0.5µm FQ-USAI I</p>	<p>DSPC:resazurina: pinocembrina</p>  <p>X1,000 10µm FQ-USAI I</p>

Lo más importante de destacar es que con estas imágenes se confirman las hipótesis que: i) la presencia del colesterol evita la deformación de la superficie del liposoma, pues es el único sistema en el que se observa una morfología totalmente esférica, ii) se presenta deformación de liposomas en sistemas con resazurina por su intercalación entre las cabezas de los fosfolípidos, obteniéndose estructuras grandes que se agregan y iii) ocurre fusión en el sistema DSPC: pinocembrina, observado en la relación molar 4:1.

Por otro lado, la formación de dominios en liposomas con diferentes concentraciones de pinocembrina, se puede observar también, en las micrografías mostradas en la Tabla 8-6. Si bien el liposoma presentó una morfología tubular, la formación de dominios ocasiona una mayor deformación del liposoma, presentándose un mayor alargamiento con altas concentraciones de pinocembrina.

Tabla 8-6. SEM de liposomas con pinocembrina a diferentes concentraciones



Para hacer más evidente lo descrito para la Tabla 8-7, se presentan los resultados de tamaño de los liposomas obtenidos a partir de las micrografías, donde se

observa que la cantidad creciente de pinocembrina ocasiona un aumento de la longitud del liposoma.

Tabla 8-7. Tamaño de liposomas con pinocembrina a diferentes concentraciones

Un pico	Dos picos			
0.236 mg/mL	0.662 mg/mL		0.994 mg/mL	
Diámetro (nm)	Largo (nm)	Ancho (nm)	Largo (nm)	Ancho (nm)
69.8 ± 11.3	277.5 ± 36.4	206.8 ± 22.7	1900.7 ± 425.3	543.8 ± 79.6

8.3 Eficiencia de incorporación

La Tabla 8-8 indica los datos obtenidos por Espectrofotometría UV-VIS y los cálculos realizados para obtener la eficiencia de incorporación. Se indica la absorbancia, la ecuación utilizada y el factor de dilución.

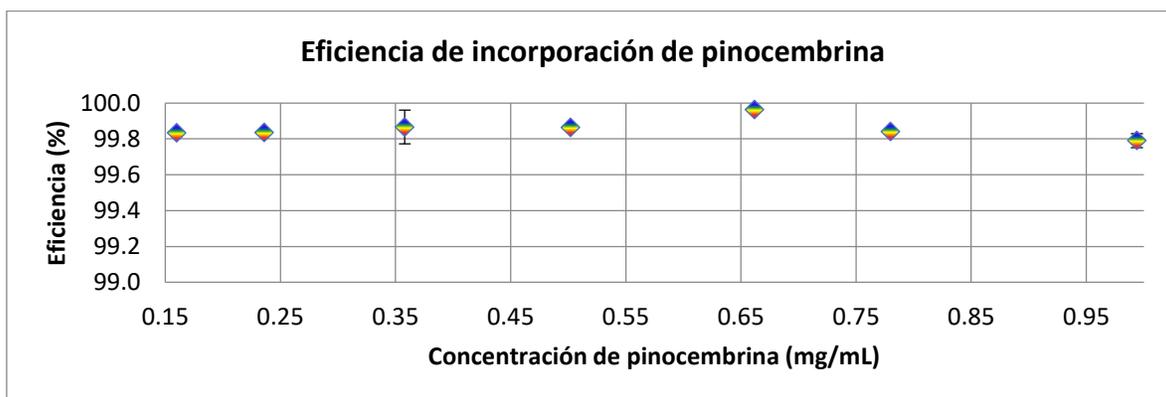
Tabla 8-8. Datos y cálculos de eficiencia de incorporación de pinocembrina a diferentes concentraciones

Concentración de pinocembrina (mg/mL)	Absorbancia a 290 nm	Conversión utilizando la Ecuación 7-2(µg/mL)	Factor de dilución: 5 Cantidad de pinocembrina en el filtrado(mg/mL)	%Retenido Ecuación 4-15
0.16	0.0287 ± 0.0030	0.27 ± 0.03	0.0013 ± 0.0002	99.83 ± 0.02
0.236	0.0403 ± 0.0015	0.39 ± 0.02	0.0019 ± 0.0001	99.84 ± 0.01
0.358	0.0490 ± 0.0382	0.48 ± 0.39	0.0024 ± 0.0020	99.87 ± 0.09
0.502	0.0690 ± 0.0060	0.69 ± 0.06	0.0034 ± 0.0003	99.86 ± 0.01
0.662	0.0263 ± 0.0055	0.24 ± 0.03	0.0012 ± 0.0001	99.99 ± 0.01
0.78	0.1227 ± 0.0124	1.25 ± 0.13	0.0062 ± 0.0006	99.84 ± 0.02
0.994	0.2033 ± 0.0370	2.09 ± 0.38	0.0104 ± 0.0019	99.79 ± 0.04

En la Gráfica 8-18, todos los valores se aproximan a 99.8%, esto se debe a que la pinocembrina es altamente hidrofóbica, poco soluble en agua y, por lo tanto, ésta solamente puede incorporarse dentro de la bicapa. Es importante resaltar que a pesar de que literatura refiere que la incorporación de grandes cantidades de compuestos lipofílicos en la bicapa del liposoma durante la preparación, puede conducir a bajas eficiencias de atrapamiento en el producto final, lo cual puede ser

explicado por mayor probabilidad de que ocurra formación de dominios. Esto no sucede en liposomas de DSPC con pinocembrina, probablemente por la longitud de las cadenas del fosfolípido que permiten un acomodo eficiente y mayor porcentaje de captura.

Gráfica 8-18. Eficiencia de incorporación de pinocembrina a diferentes concentraciones



8.4 pH de sistemas liposomales DSPC

En la Tabla 8-9 se muestra que el pH es ácido en la mayoría de los sistemas indicados. Si se deseara aumentar la estabilidad de los sistemas, el pH podría ser considerado para la optimización de la formulación, pues estudios refieren que pH neutros o alcalinos, reducen la formación de poros en la bicapa, favoreciendo la estabilidad de un fármaco incorporado en el liposoma (Roy et al., 2016). No obstante, esto no fue observado en los liposomas con pH neutro (sistemas con resazurina) debido a la interacción que presenta la molécula con pinocembrina.

Tabla 8-9. Valores de pH de liposomas de DSPC

Sistema	pH
DSPC	2.81
DSPC:colesterol 2:1	3.46
DSPC:colesterol 4:1	3.52
DSPC:colesterol: pinocembrina 4:1:1	3.41
DSPC:colesterol: pinocembrina 4:2:1	3.29
DSPC: pinocembrina 4:1	3.56
DSPC:resazurina 4:1	6.88
DSPC:resazurina: pinocembrina 4:1:1	6.79

Capítulo 9 Conclusiones

- Se demuestra que es posible incorporar moléculas de diferente hidrofiliicidad en un mismo sistema liposomal.
- Resazurina y pinocembrina son agentes caotrópicos dentro del liposoma.
- La resazurina se intercala entre las cabezas polares de los fosfolípidos de DSPC mediante interacciones electrostáticas que determinan el aumento de la entalpía en la transición de fase, distorsión de la membrana y aumento de tamaño del liposoma.
- En sistemas con pinocembrina se forman dominios a partir de concentraciones de 0.50 mg/mL con mayor y menor cantidad de esta molécula dentro de la bicapa.
- A partir de concentraciones de 0.50 mg/mL, la pinocembrina sufre reacomodos dentro de la bicapa de DSPC y se obtiene el equilibrio con la aplicación de calor.
- Bajas cantidades de moléculas de pinocembrina, inducen desorden en la bicapa, mientras que cantidades mayores forman estructuras tipo cristal que inducen orden.
- La presencia de colesterol al 50% evita la formación de dominios ricos y pobres de pinocembrina en la relación molar 4:1
- Pinocembrina ocasiona fluidización de membrana por debajo de concentración 0.50 mg/mL.
- Existe una interacción entre pinocembrina y resazurina, que promueve la formación partículas brillantes como resultado la interacción de ambas moléculas en el liposoma.
- La pinocembrina y el colesterol se insertan entre los primeros carbonos de la cadena de acilo de los fosfolípidos, actuando como espaciadores estructurales que abaten las fuerzas de van der Waals entre fosfolípidos
- La presencia de colesterol, evita la deformación de la bicapa lipídica pero no aumenta la estabilidad del sistema.
- Los sistemas más estables a 4°C son: DSPC (más de 60 días), DSPC: resazurina (más de 28 días), DSPC:pinocembrina (28 días).

- Los liposomas con resazurina se agregan, mientras que los liposomas con pinocembrina se fusionan.

Capítulo 10 Perspectivas

Este estudio mostró varias funcionalidades de liposomas de DSPC. Se obtuvieron determinados parámetros que son indicadores de la estabilidad, la eficiencia de incorporación y encapsulación de moléculas, lo que tienen interés en investigaciones sobre actividades anticancerígenas y otras actividades biológicas. Dado que los resultados muestran que los liposomas de DSPC son excelentes nanoacarreadores de pinocembrina, cabe la posibilidad de que estos sistemas impliquen una alternativa terapéutica eficaz contra el cáncer, que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Es necesario que se realicen pruebas *in vitro* que demuestren su posible potencial de uso. Con la optimización de la formulación, que este estudio sugiere, sería factible realizar las pruebas farmacocinéticas (pruebas *in vivo*) correspondientes, que contribuyan significativamente al mejoramiento de las características requeridas para que los liposomas sean un tratamiento seguro y efectivo.

Capítulo 11 Bibliografía

- Abedi Karjiban, R., Shaari, N. S., Gunasakaran, U. V., & Basri, M. (2013). A coarse-grained molecular dynamics study of DLPC, DMPC, DPPC, and DSPC mixtures in aqueous solution. *Journal of Chemistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/931051>
- Ahmed, S., & Othman, N. H. (2013). Honey as a potential natural anticancer agent: A review of its mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(c). <https://doi.org/10.1155/2013/829070>
- Aygun, A., Torrey, K., Kumar, A., & Stephenson, L. D. (2012). Investigation of factors affecting controlled release from photosensitive DMPC and DSPC liposomes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9724-6>
- Bhardwaj, U., & Burgess, D. J. (2010). Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1–2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.003>
- 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(3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>
- 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*. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>
- Castile, J. D., & Taylor, K. M. . (1999). Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*, 188(1), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00207-0)
- Chamati, H., Trobec, R., & Pavlic, J. I. (2016). *Peculiarities in the study of*

performed DSPC lipid vesicles by coarse grain molecular dynamics. Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly (1st ed., Vol. 23). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2015.12.002>

Demetzos, C. (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. <https://doi.org/10.1080/08982100802310261>

El Maghraby, G. M. M., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2005). Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. *International Journal of Pharmaceutics*, 292(1–2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.11.037>

Elizalde Domínguez, P. (2018). *Caracterización fisicoquímica de la nanoencapsulación de un flavonoide (Pinocembrina) en liposomas de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)* (UNAM). México.

Fatouros, D. G., & Antimisiaris, S. G. (2002). Effect of Amphiphilic Drugs on the Stability and Zeta-Potential of Their Liposome Formulations: A Study with Prednisolone, Diazepam, and Griseofulvin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 251(2), 271–277. <https://doi.org/10.1006/JCIS.2002.8432>

Felipe, A. (2017). *Estudio fisicoquímico de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de Diestearoil fosfatidilcolina y Octil beta-D-Glucopiranosido*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gallus, Jürgen; Lin, Qiong; Zumbühl, Andreas; Friess, Sebastian D.; Hartmann, Rudolf; Meister, E. C. (2001). Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. *Journal of Chemical Education*, 78(961). Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed078p1251>

Goniotaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., & Demetzos, C. (2004). Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1211/0022357044382>

- Hanieh, H., Hairul Islam, V. I., Saravanan, S., Chellappandian, M., Ragul, K., Durga, A., ... Thirugnanasambantham, K. (2017). Pinocembrin, a novel histidine decarboxylase inhibitor with anti-allergic potential in in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 814(January), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.012>
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., & Benoit, J. P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283–4300. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00331-4)
- Hotani, H., Inaba, T., Nomura, F., Takeda, S., Takiguchi, K., Itoh, T. J., ... Ishijima, A. (2003). Mechanical analyses of morphological and topological transformation of liposomes. *Biosystems*, 71(1–2), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0303-2647\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0303-2647(03)00113-8)
- Ikonen, M., Murtomäki, L., & Kontturi, K. (2010). Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2010.03.017>
- Jain, M. K., & Wu, N. M. (1977). Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. *The Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/BF01870299>
- Ju Yuan, Jiaguo Liu, YuanLiang Hu, Yunpeng Fan, Deyun Wang, Liwei Guo, T. L. N., & Xiaojuan Zhao, Xu Liu, Cui Liu, Y. W. (2012). The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against ND vaccine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 400–405.
- Kneidl, B., Peller, M., Winter, G., Lindner, L. H., & Hossann, M. (2014). Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49297>

- Kuete, V., Mbaveng, A. T., Zeino, M., Fozing, C. D., Ngameni, B., Kapche, G. D. W. F., ... Efferth, T. (2015). Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 22(12), 1096–1102. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.006>
- Li, H., Zhao, T., & Sun, Z. (2018). Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Reviews in Analytical Chemistry*, 37(1), 1–23. <https://doi.org/10.1515/revac-2017-0012>
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- Li, T., Cipolla, D., Rades, T., & Boyd, B. J. (2018, October 28). Drug nanocrystallisation within liposomes. *Journal of Controlled Release*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.001>
- Li, X.-C., Ferreira, D., & Ding, Y. (2010). Determination of Absolute Configuration of Natural Products: Theoretical Calculation of Electronic Circular Dichroism as a Tool. *Current Organic Chemistry*, 14(16), 1678–1697. <https://doi.org/10.2174/138527210792927717>
- Loginov, M., Samper, F., Gésan-Guiziu, G., Sobisch, T., Lerche, D., & Vorobiev, E. (2017). Centrifugal ultrafiltration for determination of filter cake properties of colloids. *Journal of Membrane Science*, 536(April), 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.04.064>
- Lubensky, T. C., & MacKintosh, F. C. (1993). Theory of “ripple” Phases of Lipid Bilayers. *Physical Review Letters*, 71(10), 1565–1568. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.71.1565>
- Maulik P. R. (1996). Interactions of N-Stearoyl Sphingomyelin with Cholesterol and Dipalmitoylphosphatidylcholine in Bilayer Membranes. *Biophysical Journal*, 70,

2256–2265. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0006349596797916/1-s2.0-S0006349596797916-main.pdf?_tid=bf68f4a2-9291-4cf0-b1b6-1d42b076836d&acdnat=1536773260_0ffc429c125b5e6b0812a0d404d1a8aa

Mcghie, T. K. (2013). Secondary Metabolite Components of Kiwifruit. *Advances in Food and Nutrition Research*, 68, 101–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394294-4.00006-7>

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(2), 516–522. <https://doi.org/10.1021/bi00053a016>

Mehn, D., Iavicoli, P., Cabaleiro, N., Borgos, S. E., Caputo, F., Geiss, O., ... Gilliland, D. (2017). Analytical ultracentrifugation for analysis of doxorubicin loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.046>

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., & Peter Slotte, J. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1), 66–97. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0)

Ohvo-Rekilä, H. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1), 66–97. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0)

Oroian, M., & Ropciuc, S. (2017). Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Computers and Electronics in Agriculture*, 138, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.04.020>

- Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>
- Rasul, A., Millimouno, F. M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2013). Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/379850>
- Rho, H., Chon, K., & Cho, J. (2018). Surface charge characterization of nanofiltration membranes by potentiometric titrations and electrophoresis: Functionality vs. zeta potential. *Desalination*, 427, 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2017.11.003>
- Roy, B., Guha, P., Bhattarai, R., Nahak, P., Karmakar, G., Chettri, P., & Panda, A. K. (2016). Influence of Lipid Composition, pH, and Temperature on Physicochemical Properties of Liposomes with Curcumin as Model Drug. *Journal of Oleo Science*. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15229>
- S. M. Ohline, M. L. Campbell, M. T. Turnbull, and S. J. K. (2000). Differential Scanning Calorimetry of Bilayer Membrane Phase Transitions 1,2 S. M. Ohline, M. L. Campbell, M. T. Turnbull, and S. J. Kohler Dept. of Chemistry, Wellesley College Background Reading: D. L. Nelson, M. M. Cox, Lehninger: Principles of Biochemi. *Cell*, 391–395. Retrieved from <https://www.colby.edu/chemistry/PChem/lab/DSCMembrane.pdf>
- Saavedra, N., Cuevas, A., Cavalcante, M. F., Dörr, F. A., Saavedra, K., Zambrano, T., ... Salazar, L. A. (2016). Polyphenols from Chilean Propolis and Pinocembrin Reduce MMP-9 Gene Expression and Activity in Activated Macrophages. <https://doi.org/10.1155/2016/6505383>
- Saija, A., Bonina, F., Trombetta, D., Tomaino, A., Montenegro, L., Smeriglio, P., & Castelli, F. (1995). Flavonoid-biomembrane interactions: A calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *International Journal of*

Pharmaceutics, 124(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00051-J](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00051-J)

Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2015). Influence of membrane lipid composition on flavonoid–membrane interactions: Implications on their biological activity. *Progress in Lipid Research*, 58, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2014.11.002>

Spink, C. H. (2015). The deconvolution of differential scanning calorimetry unfolding transitions. *Methods*, 76, 78–86. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.12.001>

Tsai, W. C., & Rizvi, S. S. H. (2017). Simultaneous microencapsulation of hydrophilic and lipophilic bioactives in liposomes produced by an ecofriendly supercritical fluid process. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.029>

Van Dijk, C., Driessen, A. J. M., & Recourt, K. (2000). The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00488-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00488-3)

Wu, R. G., Wang, Y. R., Wu, F. G., Zhou, H. W., Zhang, X. H., & Hou, J. L. (2012). A DSC study of paeonol-encapsulated liposomes, comparison the effect of cholesterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior of liposomes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 109(1), 311–316. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2331-5>

Zrimšek, P., Kunc, J., Kosec, M., & Mrkun, J. (2004). Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *International Journal of Andrology*, 27(1), 57–62. <https://doi.org/10.1046/j.0105-6263.2003.00448.x>