



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA NANOENCAPSULACIÓN DE IBUPROFENO EN
VESÍCULAS MIXTAS DE LIPOSOMAS DE L-ALFA-DIPALMITOIL-FOSFATIDILCOLINA
(DPPC) Y N-NONIL-BETA-D-GLUCOPIRANÓSIDO (NGP).**

TESIS

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

PRESENTA

CHRISTIAN JAVIER MARTÍNEZ GALICIA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: SILVIA DEL SOCORRÓ PEREZ CASAS

VOCAL: Profesora: MA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SECRETARIO: Profesora: ALMA MIRIAM NOVELO TORRES

1er. SUPLENTE: Profesora: MARIA JOSEFA BERNAD

2° SUPLENTE: Profesor: JOSE ABRAHAM ORTINEZ ALVAREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIO-FISICOQUÍMICA, EDIFICIO F-301

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. CARLOS JUAREZ OSORNIO

SUSTENTANTE:

MARTÍNEZ GALICIA CHRISTIAN JAVIER

Contenido

1. Introducción.....	1
1.1 Objetivos.....	1
1.1.1 Generales.....	1
1.1.2 Particulares.....	1
1.2 Hipótesis.....	1
1.3 Generalidades.....	2
1.3.1 Lípidos.....	2
1.3.1.1 ¿Qué son los liposomas?.....	4
1.3.1.2 Clasificación de los liposomas.....	4
1.3.1.3 Técnicas de obtención de liposomas.....	5
1.3.2 Tensoactivos.....	7
1.3.2.1 Generalidades.....	7
1.3.2.2 Clasificación.....	7
1.3.2.3 Tensoactivos glucopiranosidos.....	9
1.3.2.4 Micelas y CMC.....	10
1.3.3 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	11
1.3.3.1 Biodisponibilidad.....	12
1.3.3.2 Factores que afectan a la biodisponibilidad de un fármaco...	12
1.3.4 Propiedades termodinámicas.....	12
1.3.4.1 Potenciales termodinámicos.....	12
1.3.4.1.1 Energía de Gibbs.....	12
1.3.4.1.2 Entalpía.....	14
1.3.4.1.3 Entropía.....	15
1.3.5 Modelo de 3 estados de de Lichtenberg.....	15
1.3.5.1 Análisis termodinámico de la titulación.....	16
1.3.5.2 Descripción matemática del modelo termodinámico <i>coeficiente de partición K relación-molar</i> de Schurtenberger.....	18
1.4 Referencias.....	21
2 Técnicas experimentales.....	23
2.1 Técnica de Dispersión dinámica de luz (DLS).....	23

2.1.1	Fundamentos.....	23
2.1.2	Instrumentación.....	28
2.2	Técnicas calorimétricas.....	29
2.2.1	Calorimétrica Isotérmica de Titulación.....	29
2.2.1.1	Fundamentos de la técnica e instrumentación.....	30
2.2.2	Calorimetría diferencial de barrido.....	32
2.2.2.1	Fundamentos de la técnica.....	32
2.2.2.2	Instrumentación.....	39
2.3	Técnicas de microscopía electrónica.....	40
2.3.1	Fundamentos.....	43
2.3.2	Instrumentación.....	51
2.4	Referencias.....	51
3	Material y métodos.....	53
3.1	Materiales.....	53
3.1.1	Fosfolípido.....	53
3.1.2	Tensoactivo.....	53
3.1.3	Fármaco.....	53
3.1.4	Colesterol.....	53
3.1.5	Otros materiales.....	53
3.2	Metodología.....	54
3.2.1	Preparación de liposomas por el método Banham y homogenización por extrusión	55
3.3	Referencias.....	56
4	Resultados y discusión. Estudio de la formación y titulación de liposomas con monómeros de NGP.....	57
4.0	Monitoreo de la estabilidad del tamaño de partícula de los sistemas a titular.....	57
4.1	Sistema DPPC (10mM).....	59
4.1.1	DSL, SEM, TEM y DSC	59
4.2	Sistema DPPC (10mM) + NGP (4mM) por ITC.....	61
4.2.1	DLS, SEM, TEM y DSC	61

4.3 Sistema DPPC (10mM): CHOL (4:1).....	67
4.3.1 DSL, SEM, TEM y DSC	67
4.4 Sistema DPPC (10mM): CHOL (4:1) + NGP (4mM).....	72
4.4.1 DSL, SEM y TEM.....	72
4.5 Sistema DPPC (10mM); IBU (8:1).....	78
4.5.1 DLS, SEM y TEM.....	78
4.6 Sistema DPPC(10mM): IBU (8:1) + NGP (4mM).....	81
4.6.1 DLS, SEM y TEM.....	81
4.7 Sistema DPPC: CHOL: IBU.....	87
4.7.1 DLS, SEM y TEM.....	87
4.8 Sistema DPPC(10mM): CHOL: IBU (8: 1.7: 1) + NGP (4mM).....	91
4.8.1 DLS, SEM y TEM.....	91
4.9 Resumen de parámetros.....	97
4.10 Conclusiones.....	107
4.11 Referencias.....	107
5 Abreviaturas	108

1 Introducción

1.1.1 Objetivos generales

- Determinar las condiciones experimentales óptimas para la preparación de liposomas y vesículas mixtas de DPPC con NGP.
- Determinar el efecto de la incorporación de colesterol (Chol) y/o ibuprofeno (IBU) en las membranas lipídicas y vesículas mixtas.
- Determinar el coeficiente de partición K , la entalpía molar, la entropía molar de unión y la energía de Gibbs molar (ΔH° , ΔS° y ΔG°) del proceso de partición.
- Determinar el tamaño de partícula, la morfología y la estructura de los sistemas fabricados.

1.1.2 Objetivos particulares

- Estudiar mediante las técnicas calorimétricas (ITC y DSC), las transiciones (liposomas → micelas → vesículas mixtas) que induce el NGP en las bicapas de DPPC.
- A través de las técnicas dispersivas SEM, TEM y DLS, determinar la morfología y tamaño de partícula de los sistemas fabricados.

1.2 Hipótesis

- El ibuprofeno es un fármaco que posee una baja solubilidad en agua, la alternativa de solubilizarlo en vehículos como los liposomas ofrece una posibilidad para su administración. La adición de Colesterol y/o tensoactivo en los liposomas puede mejorar la estabilidad física y fisicoquímica de los mismos para la encapsulación de ibuprofeno, de este modo, mediante las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos y las transiciones de fase (liposomas → a micelas mixtas → a vesículas mixtas) durante la partición del

tensoactivo en los distintos sistemas liposomales fabricados, se identificara el sistema fisicoquímico más estable que encapsule al fármaco.

1.3 Generalidades

1.3.1 Lípidos

Los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua. Las funciones biológicas de los lípidos son tan diversas como su química. En muchos organismos, las grasas y los aceites son las formas principales de almacenamiento energético mientras que los fosfolípidos constituyen los principales elementos estructurales de las membranas biológicas (Ref. 1)

Los fosfolípidos predominantes en la mayoría de las membranas son fosfoglicerol, ésteres de glicerol fosfato. Los fosfolípidos tienen tres grupos funcionales: 1) dos cadenas largas de acilo, usualmente con un número par de átomos de carbono; 2) el componente de glicerol; y 3) la cabeza del grupo fosfato. En la figura 1.3a se muestra la estructura general de la clase de fosfolípido que se estudiará en este trabajo, la fosfatidilcolina (lecitina). (Ref. 2)

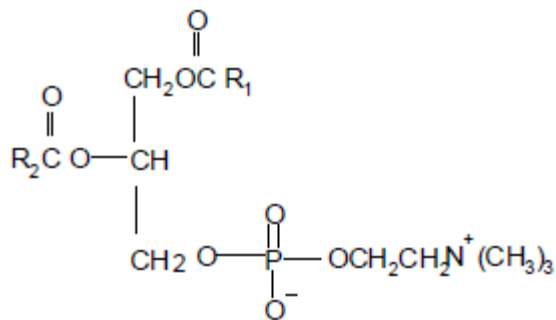


Fig. 1.3a. Fosfatidilcolina. R1 y R2 son cadenas de acilo saturadas derivadas de ácidos grasos. R1 y R2 son los mismos en este experimento, el ácido palmítico.

A continuación se muestra esquemáticamente la estructura de la molécula de fosfolípido de L-alfa-dipalmitoil-Fosfatidilcolina en el estado cristalino (cristal-líquido) fig. 1.3b.

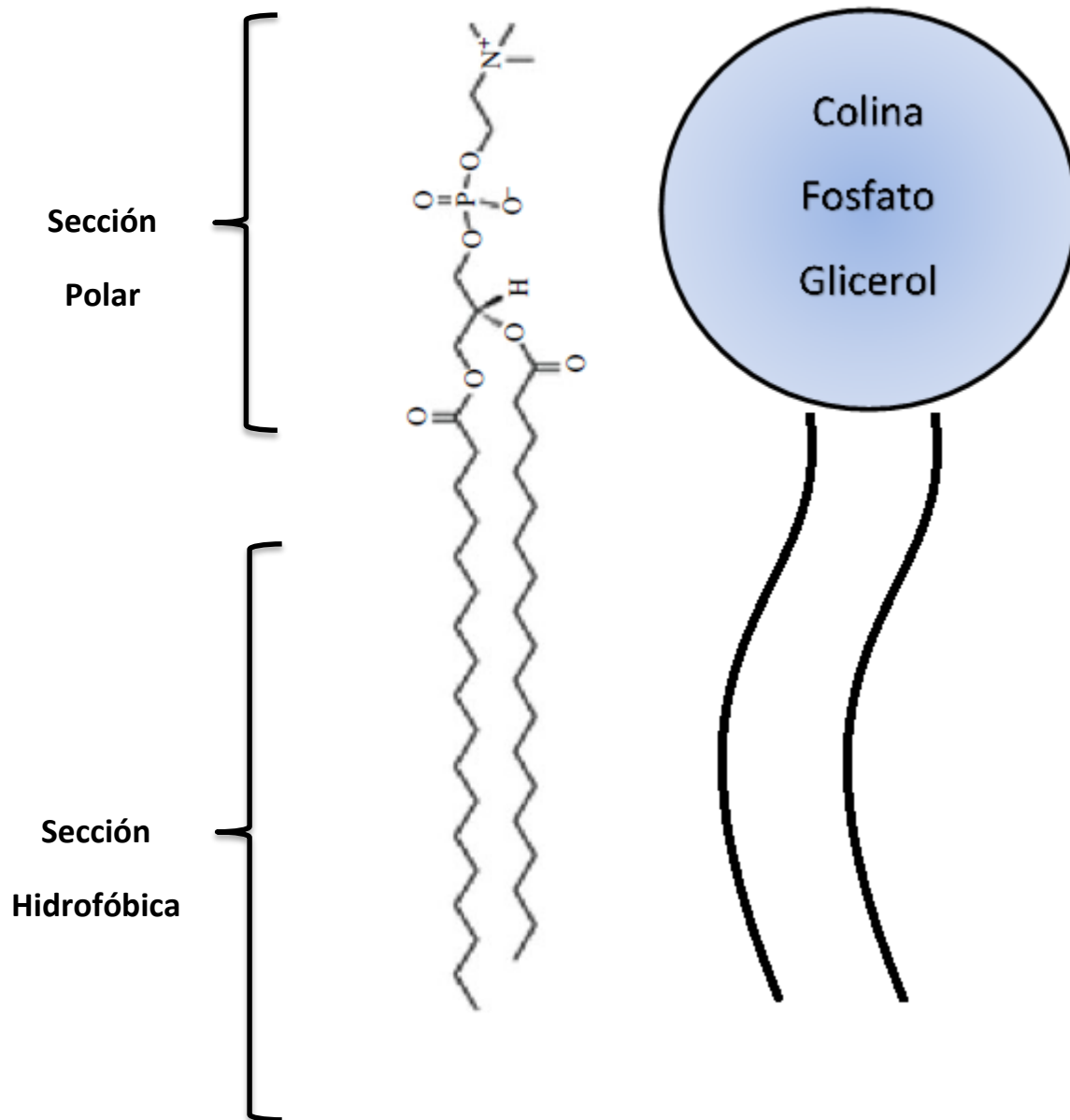


Fig. 1.3b. Se muestra esquemáticamente la sección hidrofóbica y polar del DPPC.

1.3.1.1 ¿Qué son los liposomas?

Los liposomas están hechos de moléculas anfifílicas, que son moléculas compuestas por las regiones polar y no polar. La exposición de los restos hidrófobos al agua es, sin duda, termodinámicamente infavorable. La protección de estas porciones de la solución acuosa es posible a través de la auto-agregación de los anfifilos. De esta forma, por arriba de cierta concentración crítica, que depende del anfifilo y del medio acuoso, más anfifilos se auto-agregan.

Todos ellos comparten una característica común: las porciones apolares forman un núcleo hidrofóbico, mientras que los grupos polares de los agregados interactúan con el medio acuoso. Como regla general, los anfifilos formarán los más pequeños agregados posibles en que la porción hidrofoba de la molécula tiene el contacto mínimo con agua. Los agregados que pueden encerrar compartimentos acuosos se definen como liposomas.

Los fosfolípidos con dos cadenas largas de hidrocarburos, cuando se dispersan en medios acuosos por encima de su transición de fase de gel a líquido T_m forman espontáneamente bicapas que son impermeables a los iones atrapados, formando lamelas biomoleculares concéntricas con agua ocupando el espacio entre ellas. (Ref. 3)

1.3.1.2 Clasificación de los liposomas

Los liposomas pueden ser clasificados basándose en el método de preparación, por el número de bicapas presentes en la vesícula o por el tamaño (fig. 1.3c). Y sin embargo, la clasificación de los liposomas por el número de bicapas y el tamaño es el más empleado. Con base en el número de bicapas y de vesículas, los liposomas son clasificados como ULVs (unilamellar vesicles) por sus siglas en inglés, de 25 nm a 1 μm de diámetro; o MLVs (multi large vesicles) de 0.1-15 μm o MVVs (multi vesicular vesicles) de 1.6-10.5 μm . Sin embargo, basado en el tamaño, los liposomas unilamelares son clasificados como LUVs (large unilamellar vesicles, de 100nm a 1 μm , y SUVs (small unilamellar vesicles) de 25-50nm. (Ref. 4)

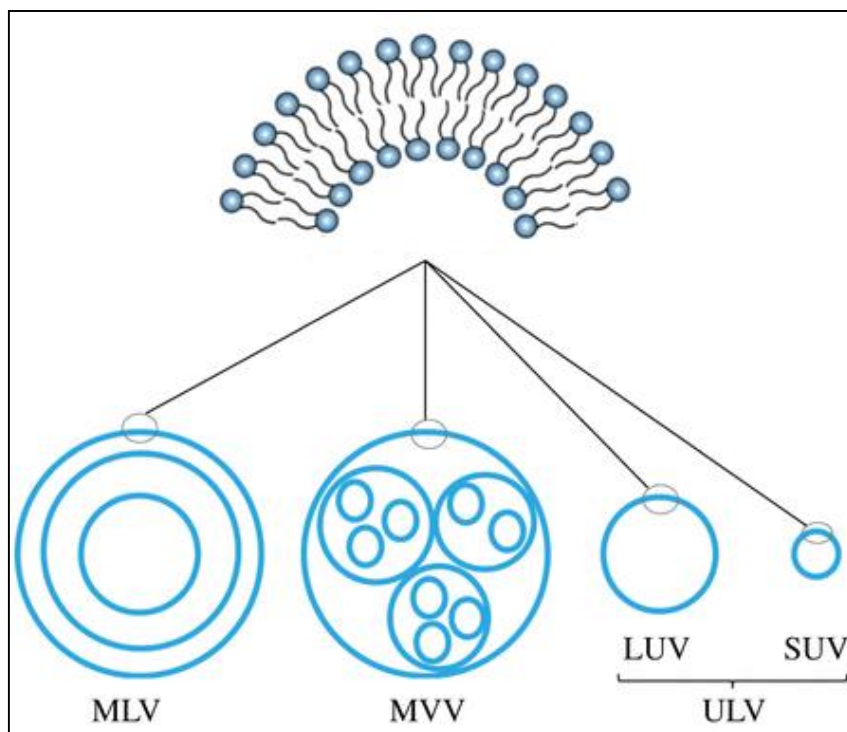


Fig. 1.3c. Bicapas lipídicas y tipos de liposomas: MLVs, MVVs, ULVs. Los ULVs se clasifican a su vez en LUVs y SUVs. (Ref. 5)

1.3.1.3 Técnicas de obtención de Liposomas

Método Banham.

Una de las técnicas más extensamente usadas para la formación de vesículas es la "hidratación de la película delgada" o "método Banham", en el cual una película seca es hidratada con una fase acuosa. Esta técnica provee grandes y no homogéneos MLV, con bajas eficiencias de encapsulación.

Método evaporación fase reversa (REV por sus siglas en inglés) o inyección de disolvente.

En el método de fase inversa, la hidratación de los lípidos se lleva a cabo directamente a partir de un disolvente orgánico. Es común usar como solución orgánica etanol o éter. La formación de LUVs se produce tras la dilución con

disolvente en el caso del etanol, mientras que en el procedimiento de éter, la hidratación se lleva a cabo a medida que el disolvente se evapora. Aunque las técnicas de fase inversa presentan eficiencias de encapsulación más altas que la "hidratación de la película delgada", están limitadas por la solubilidad de los lípidos en la fase orgánica y la posterior eliminación del disolvente de la preparación final.

Método de agotamiento de tensoactivo.

Implica la formación de micelas de tensoactivo de lípidos por la hidratación de una película lipídica con una solución de tensoactivo. Como se elimina el tensoactivo, las micelas se fusionan y los fosfolípidos adoptan la configuración bicapa, lo que resulta en vesículas. Generalmente, los problemas asociados con la eliminación del tensoactivo, que incluyen la baja eficiencia de atrapamiento y la longitud de preparación, limitan el uso de técnicas a base de tensoactivo en la producción de LUVs

Método de deshidratación-rehidratación descrito por Kirby y Gregoriadis.

La técnica consiste en el secado o la liofilización de las vesículas preformadas en un medio acuoso que contiene el soluto y la rehidratación controlada subsiguiente. Durante el proceso de secado, las vesículas lipídicas se concentran de forma concomitante con soluto y en algún momento, se funden en grandes agregados que contienen el material a ser atrapado. Por lo que el soluto está presente en muchos de los espacios inter-bicapas cuando se rehidrata, el atrapamiento es de alta eficiencia. Aunque las eficiencias de atrapamiento son más altas, el método de deshidratación-rehidratación suele dar sistemas heterogéneos con baja reproducibilidad, lo que lo convierte en un inconveniente para su producción.

Con todas las técnicas expuestas, se obtienen MLVs habitualmente por lo tanto, se requiere un procesamiento de post-trasformación para lograr las propiedades de tamaño, lamellaridad y homogeneidad deseadas, que permitan el mejor funcionamiento de los sistemas vesiculares preparados. Los métodos más comunes para el procesamiento son: sonicación y extrusión, que finalmente forman SUVs. (Ref. 6)

1.3.2 Tensoactivos

1.3.2.1 Generalidades

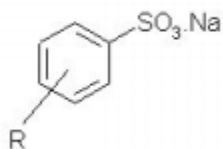
Todos los agentes tensoactivos tienen una característica estructural en común: son moléculas anfifílicas; esto es, la molécula consta de dos partes distintas, una unidad hidrófoba y una unidad hidrófila. Las unidades hidrófobas son cadenas o anillos de hidrocarburos o una mezcla de ambos. Las unidades hidrófilas son grupos polares, tales como el grupo carboxilo, sulfato o sulfonato.

1.3.2.2 Clasificación

La clasificación más utilizada en su comportamiento iónico en solución acuosa. Utilizando este procedimiento, existen cuatro tipos de tensoactivos; aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros. (Ref. 7).

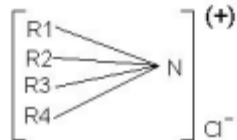
Tensoactivos aniónicos

En solución se ionizan, y el grupo hidrófobo queda cargado negativamente. Están constituidos por una cadena alquílica lineal o ramificada que va de 10 a 14 átomos de carbono y en el extremo polar de la molécula, se encuentra un anión. Representantes de este grupo son los derivados del ion sulfato o sulfonatos como es el dodecil sulfato de sodio o dodecilbencensulfonato de sodio. Fórmula general:



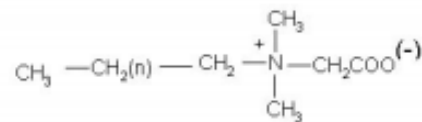
Tensoactivos catiónicos

Son aquéllos que en solución forman iones, donde el grupo hidrófobo se carga positivamente el grupo hidrófobo de la molécula. En general como representante de este grupo se encuentran los compuestos cuaternarios de amonio o una amina grasa en medio ácido. Fórmula general:



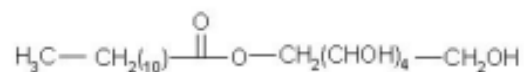
Tensoactivos anfóteros

Como su nombre lo indica, actúan dependiendo del medio en que se encuentren, en medio básico son aniónicos y en medio ácido son catiónicos. Fórmula general: alquildimetilbetaína:



Tensoactivos no-iónicos

Los surfactantes o tensoactivos no-iónicos son aquéllos que sin ionizarse, se solubilizan mediante un efecto combinado de un cierto número de grupos solubilizantes débiles (hidrófilos) tales como enlace tipo éter o grupos hidroxilos en su molécula. Como representantes están los alcoholes grasos o fenoles a los que se les agregan una o varias moléculas de óxido de etileno; ejemplo de ellos el nonil fenol etoxilado. Fórmula genral: Laurato de sorbitán:



Las propiedades generales y el comportamiento de los agentes tensoactivos se deben al carácter dual de sus moléculas (grupo hidrófilo y lipófilo); es así como el antagonismo entre estas dos secciones de su molécula y el equilibrio entre ellas, es la que da al compuesto sus propiedades activas de superficie. El grupo hidrófilo ejerce un efecto solubilizante y tiende a llevar a la molécula a disolución completa. El grupo hidrófobo en cambio, debido a su insolubilidad, tiende a contrarrestar la tendencia del otro. Si se logra el equilibrio adecuado entre los dos grupos se ve que la sustancia no se disuelve por completo, ni queda sin disolver del todo, concentrándose en la interface con sus moléculas orientadas de tal forma que los grupos hidrófilos se orientan hacia la fase acuosa, mientras que los hidrófobos hacia la no acuosa o a la fase vapor. (Ref. 8).

1.3.2.3 Tensoactivos Glucopiranósidos

Son tensoactivos derivados de carbohidratos, los cuales son de tipo no iónico, pertenecen al grupo de los alquilopoliglucósidos. Los alquilo β -glucósidos son usados ampliamente (farmacia y alimentos) ya que tiene una baja toxicidad y bajo impacto ambiental comparados con los tensoactivos tradicionales.

Fórmula empírica de los alquil poliglucósidos. La cabeza hidrofílica es caracterizada por el número de unidades de glucosa (n) en su partesacárido. El residuo hidrofóbico puede variar $H-(C_6H_{10}O_5)_n-O-C_xH_{2x+1}$ en el número de átomos de carbono (x) de la cadena de alquilo:

Consiste de un residuo de alquilo derivado de un alcohol graso y una estructura sacárido derivado de la D-glucosa, unidos a través de un enlace glicosídico. Todas las unidades de D-glucosa son polihidroxiacetales que difieren en su estructura de anillo "furanoderivable (5 miembros) o piran derivado (6 miembros) ", por lo que se les llama alquil glucofuranosidos o alquil glucopiranosido respectivamente.

Todas las unidades de D-glucosa muestran un grupo cetal, que es el átomo de carbón que está únicamente unido a dos átomos de oxígeno. Este es llamado el

carbón anomérico. El carbón anomérico es asimétrico por lo que asume diferentes configuraciones. El resultado son estero centros llamados anómeros y se distinguen por el prefijo α o β . La figura 1.3d muestra la diferencia en la orientación para α -D-glucopiranosido y el β -D-glucopiranosido mediante la proyección de Fischer así como su proyección de "Haworht".

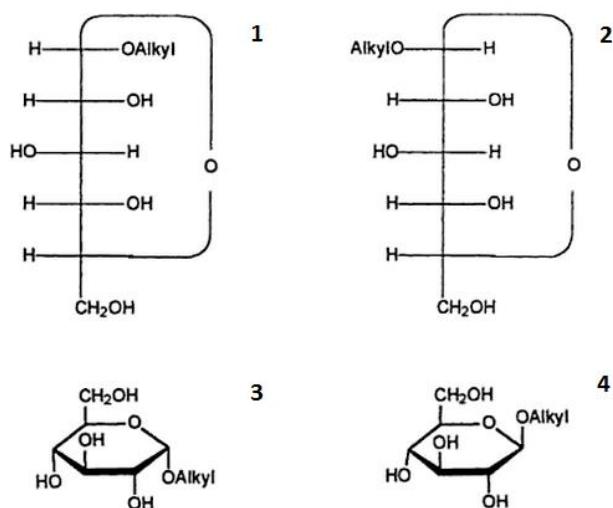


Fig.1.3d. Configuración de alquil D-glucósidos en proyección Fischer; 1) α -D-Glucopiranosido, 2) β -D-Glucopiranosido. Estructuras del anillo de alquilmonoglucósidos, mediante la proyección de Haworht: 3) α -D-Glucopiranosido, 4) β -D-Glucopiranosido. (Ref. 9)

1.3.2.4 Micelas y CMC

Una de las capacidades de las moléculas anfifílicas es su capacidad para autoagregarse en soluciones, que depende de las condiciones del sistema en el cual están disueltas. En las soluciones acuosas de moléculas anfifílicas o surfactantes hay un cambio abrupto en las propiedades fisicoquímicas cuando se alcanza una concentración específica para forma agregados coloidales. Esta concentración específica abarca un estrecho rango de concentración sobre el cual estos cambios ocurren, recibiendo el nombre de "concentración micelar crítica (CMC) y los agregados moleculares que se forman por encima de la CMC; son conocidos como "micelas". (Ref. 10)

En esta región se presenta una separación de pseudo-fase, en la cual las micelas son tratadas como una fase separada, por lo que es definida como la concentración de máxima solubilidad del monómero en un disolvente particular. (Ref. 11)

1.3.3 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINE, llamados también fármacos semejantes al ácido acetilsalicílico, ya que tiene acciones muy similares a este último.

Los tres tipos principales de efectos terapéuticos son los siguientes:

- ✓ Un efecto antiinflamatorio: modifica la reacción inflamatoria.
- ✓ Un efecto analgésico: alivio de determinados tipos de dolor (específicamente, el inflamatorio).
- ✓ Un efecto antipirético: disminución de la temperatura, cuando se encuentra elevada, en un sujeto enfermo (es decir, fiebre).

Los efectos secundarios basados en mecanismos semejantes causan:

- ✓ Irritación gástrica, la cual comprende desde molestias leves hasta formación de úlceras.
- ✓ Tendencia a prolongar la hemorragia por la inhibición de la formación de plaquetas.

Todos los efectos están relacionados con la inhibición de la enzima COX de ácidos grasos y por tanto inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Se conocen 3 isoformas: –COX-1, COX-2 y COX-3. Se ignora si la isoforma COX-3 es una isoforma funcional en el ser humano. Se sabe que la COX-1 es una enzima constitutiva que se ocupa de la síntesis de las prostaglandinas, la protección gástrica y la agregación plaquetaria. En tanto que la COX-2 se induce en las celular inflamatorias y es responsable de los mediadores de la inflamación. Se sabe que la acción antiinflamatoria está relacionada con la inhibición de la COX-2, mientras que sus efectos adversos, los que afectan el aparato gastrointestinal, se deben a la inhibición de la COX-1. (Ref. 12).

1.3.3.1 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es un término en farmacocinética, que describe el grado y la rapidez a la cual una sustancia o molécula terapéutica es liberada desde una forma farmacéutica hasta la circulación sanguínea general.

1.3.3.1 Factores que afectan a la biodisponibilidad de un fármaco

Entre los factores que afectan la biodisponibilidad de un fármaco están;

- ✓ Las propiedades fisicoquímicas del fármaco: Tamaño de partícula, coeficiente de partición (solubilidad en membranas), pKa.
- ✓ Las formas de dosificación: Soluciones, suspensiones, cápsulas, tabletas y **formulaciones de liberación controlada.**
- ✓ Factores fisiológicos: Variaciones en el poder de absorción a lo largo del GI, metabolismo pre-sistémico y de primer paso, edad, sexo y peso,
- ✓ Interacciones con otras sustancias: Alimentos y otros fármacos

(Ref. 13)

Estos fármacos existen en diversas formulaciones como comprimidos, inyecciones y geles. Su uso clínico más usual de administración: vía oral, vía tópica, donde ésta última se asocia a una menor incidencia de efectos adversos.

1.3.4 Propiedades termodinámicas (Ref. 14)

1.3.4.1 Potenciales termodinámicos

Los potenciales termodinámicos o funciones de estado extensivas, energía de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH), entropía (ΔS) predicen el comportamiento del proceso termodinámico.

1.3.4.1.1 Energía de Gibbs (G)

Es un potencial termodinámico, es una función de estado y una propiedad extensiva que da la condición de equilibrio y de espontaneidad de una reacción química a presión y temperatura constantes.

A partir de la definición de la ecuación de Gibbs (1) y de su diferencial (2), se obtiene la ecuación (6) que es la ecuación que representa el cambio de la energía de Gibbs para un proceso a temperatura y presión constantes.

$$G = H - TS \quad (1)$$

Donde G es la energía de Gibbs, H es la entalpía y TS es la entropía multiplicada por la temperatura.

$$dG = d(H - TS) = dH - d(TS) \quad (2)$$

Considerando que el proceso se realiza a temperatura y presión constantes se obtiene:

$$dG = dH - TdS - SdT \quad (3)$$

$$dG = dH - TdS \quad (4)$$

Se integra la ecuación (4):

$$\int_{G_1}^{G_2} dG = \int_{H_1}^{H_2} dH - T \int_{S_1}^{S_2} dS \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

La energía de Gibbs representa el criterio de espontaneidad y equilibrio en un proceso de acuerdo a las siguientes condiciones:

Si $\Delta G < 0$ El proceso es espontáneo.

Si $\Delta G = 0$ Sistema en equilibrio termodinámico o que no hay proceso.

Si $\Delta G > 0$ El proceso es no espontáneo.

1.3.4.1.2 Entalpía (H)

La entalpía se define como:

$$H = U + PV \quad (7)$$

Donde H es la entalpía, P es la presión del sistema, V es el volumen del sistema y U es la energía interna.

A partir de la ecuación que representa la primera ley de la termodinámica (8), se obtiene la relación que indica que la variación de la entalpía (ΔH) es igual al calor suministrado al sistema a presión constante, la cual se indica en la ecuación (14).

$$dU = dQ - PdV \quad (8)$$

$$dQ = dU + PdV \quad (9)$$

$$\int_1^2 dQ = \int_{U_1}^{U_2} dU + P \int_{V_1}^{V_2} dV \quad (10)$$

Considerando que el proceso se realiza a presión constante se obtiene:

$$Q_p = U_2 - U_1 + P(V_2 - V_1) \quad (11)$$

$$Q_p = U_2 + P_2 V_2 - (U_1 + P_1 V_1) \quad (12)$$

Sustituyendo la ecuación (7) en la ecuación (12) se obtiene:

$$Q_p = H_2 - H_1 \quad (13)$$

$$Q_p = \Delta H \quad (14)$$

La entalpía es el calor transferido a presión constante. En un proceso, el signo de la variación de la entalpía indica:

Si $\Delta H < 0$ proceso exotérmico Si $\Delta H > 0$ proceso endotérmico.

1.3.4.1.3 Entropía (S)

De acuerdo a la segunda ley de la termodinámica, en un sistema aislado ($V=\text{cte}$ y $U=\text{cte}$) si $\Delta S > 0$ el proceso es espontáneo, si $\Delta S < 0$ el proceso es no espontáneo y si $\Delta S = 0$ hay equilibrio termodinámico. Para Clausius el universo es aislado por lo tanto, enuncia la segunda ley de la termodinámica “La entropía del universo aumenta”.

$$dS = \frac{dQ_{\text{rev}}}{T} \quad (15)$$

La entropía desde el punto de vista microscópico, es una función de estado que mide la aleatoriedad (desorden) o número de microestados accesibles.

Cambio en el número de microestados

Si $\Delta S > 0$ Aumenta el número de microestados

Si $\Delta S < 0$ Disminuye el número de microestados

1.3.5 Modelo de 3 estados de Lichtenberg

Un esquema simple para la inducción de la solubilización de las bicapas formadas por tensoactivo es el llamado “el modelo de tres etapas”. De acuerdo a este modelo la transferencia de tensoactivo de la fase acuosa a la bicapa (etapa I) es descrita por un equilibrio de partición. Sin embargo, sólo una limitada cantidad de tensoactivo puede ser acomodado entre los fosfolípidos. Alcanzando la fracción crítica de tensoactivo/lípido, la estructura bicapa comienza a desintegrarse. Esto marca el comienzo de la etapa II donde las micelas de lípido-tensoactivo coexisten con bicapas mixtas. Estructuras intermediarias como vesículas abiertas o micelas cilíndricas, se ha postulado que ocurren dentro de esta fase. A un mayor incremento de la concentración de tensoactivo, las bicapas son completamente destruidas,

etapa III. Para las condiciones del presente experimento, los patrones de valoración que se realizaran permitirá visualizar directamente las tres etapas del modelo de Lichtenber al contravenir los límites de fase en el orden III → II → I fig. 1.3e. (Ref. 15)

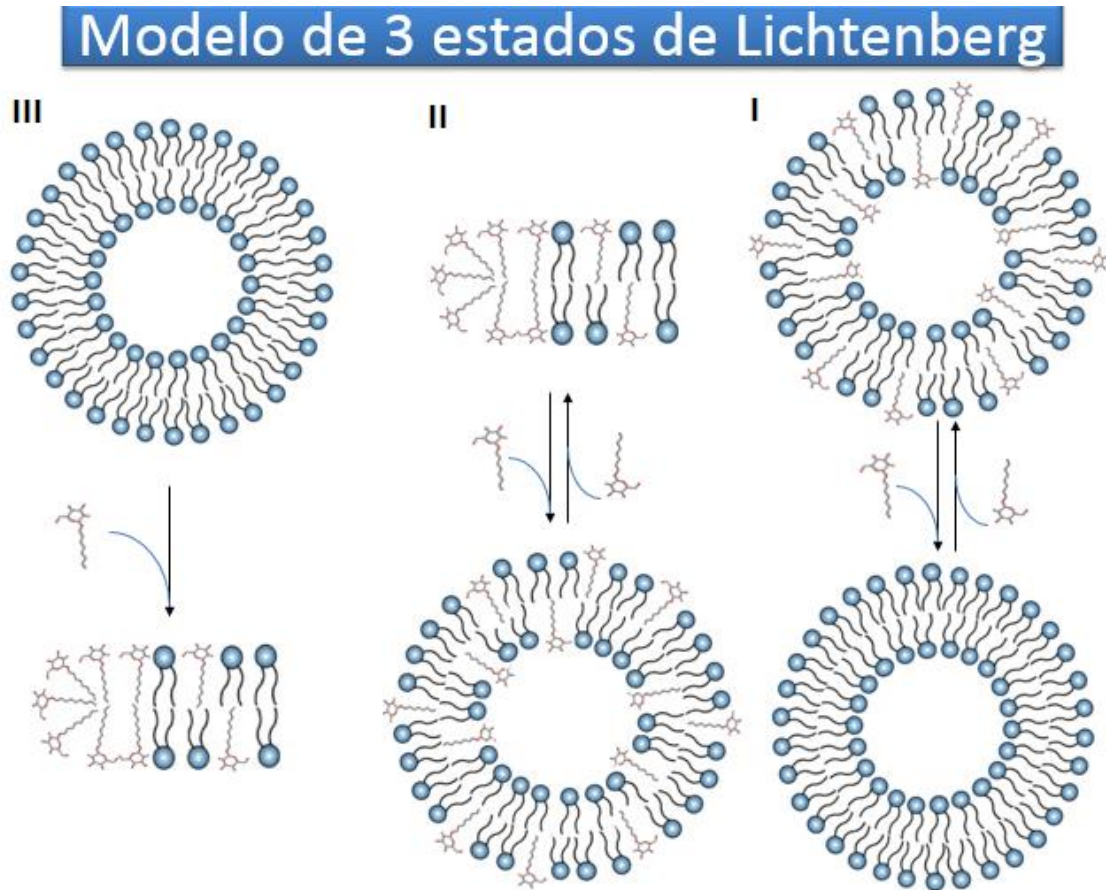


Fig. 1.3e. Se muestra esquemáticamente las tres etapas del modelo de solubilización de membranas por tensoactivo de Lichtenberg. En este experimento se invierte el proceso de etapas en el orden III → II → I, para conseguir vesículas mixtas.

1.3.5.1 Análisis termodinámico de la titulación

Si un tensoactivo es disuelto en una fase acuosa a una concentración distintivamente por debajo de su concentración micelar crítica ($C_D^0 \ll CMC$) se repartirá en la membrana sin perturbar la misma. Las propiedades físicas de la membrana cambiarán graduamente a medida que el tensoactivo "D" se acumule

y las propiedades termodinámicas también cambien con la composición de la membrana (Ref. 16)

En este trabajo las vesículas lipídicas son inyectadas dentro de una solución *monomérica* de NGP, causando la partición de las moléculas de tensoactivo dentro de la bicapa membranal. Si el tensoactivo está a una concentración suficientemente baja ($C_D \ll 6\text{mM}$), se presenta el fenómeno de partición en la membrana (Ref. 17).

Definiendo δn_i como la cantidad mol de tensoactivo unido en la etapa de inyección *i*.

El calor asociado a la reacción es

$$\delta h_i = \delta n_i \Delta H_D^0 \dots\dots\dots (1)$$

De donde

$$\delta h_i = \delta H_i - \delta H_{i-1} \dots\dots\dots (2)$$

Los cuales están definidos como: (Ref. 18)

δh_i = el calor de reacción entre el liposoma y el tensoactivo.

$\delta H_i - \delta H_{i-1}$ = el calor de reacción experimental acumulado y el calor de dilución respectivamente.

ΔH_D^0 = la entalpía de partición estándar.

Después de *i* inyecciones la cantidad total de tensoactivo unido es:

$$n_i = \sum_{i=1}^n \delta n_i \dots\dots\dots (3)$$

Dado que el calor de reacción acumulado es definido como:

$$\delta H_i = \sum_{i=1}^n \delta h_i \dots\dots\dots (4)$$

Sustituyendo (1) en (4)

$$\delta H_i = \sum_{i=1}^n \delta h_i = \sum_{i=1}^n \delta n_i \Delta H_D^0 \dots\dots\dots (5)$$

Sustituyendo (3) en (5)

$$\delta H_i = \sum_{i=1}^n \delta h_i = n_i \Delta H_D^0 \dots\dots\dots (6)$$

Despejando n_i de (6)

$$n_i = \delta H_i / \Delta H_D^0 \quad \text{o} \quad n_i = \frac{\sum_{i=1}^n \delta h_i}{\Delta H_D^0} \dots\dots\dots (7)$$

La concentración de tensoactivo unido es $C_{D,b}$ está dado por:

$$\delta C_{D,b} = \frac{n_i}{V_{cell}} \dots\dots\dots (8)$$

Sustituyendo n_i de (7) en (8)

$$\delta C_{D,b} = \frac{\sum_{i=1}^n \delta h_i}{\Delta H_D^0 V_{cell}} = \frac{\delta H_i}{\Delta H_D^0 V_{cell}} \dots\dots\dots (9)$$

$C_{D,b}$ puede ser evaluada experimentalmente del calor acumulado de reacción si se conoce ΔH_D^0 . (Ref. 17)

1.3.5.2 Descripción matemática del modelo termodinámico coeficiente de partición K relación-molar de Schurtenberger

Considerando el equilibrio de partición tensoactivo -membrana, tal que $n_{D,b}$ moles de tensoactivo son incorporados en la membrana, $n_{D,f}$ son los moles en la fase acuosa, y $n_D^0 = n_{D,b} + n_{D,f}$ es la cantidad total de tensoactivo. Si la membrana está hecha de n_L^0 moles de lípido, $R_b = n_{D,b} / n_L^0$ es la relación molar de tensoactivo insertado en la membrana (unido) al lípido total. La concentración de tensoactivo en el volumen de la fase acuosa V es $C_{D,f} = n_{D,f} / V$.

El modelo *coeficiente de partición K relación-molar* usado por Schurtenberger describe una relación lineal entre la concentración del tensoactivo libre en solución $C_{D,f}$, y la relación molar de tensoactivo insertado en la membrana R_b :

$$R_b = K C_{D,f} \dots\dots\dots (10)$$

Donde K es la constante de partición y tiene unidades de mM^{-1} . Típicamente, el agua está en exceso sobre el lípido. Si $n_{D,b}$ y n_L^0 son referidos al volumen V de la fase acuosa con $C_{D,b} = n_{D,b}/V$ y $C_L^0 = n_L^0/V$, la ecuación puede ser descrita como (Ref. 16)

Sustituyendo en (10)

$$\frac{C_{D,b}}{C_L^0} = K C_{D,f} \dots\dots\dots (11)$$

El modelo que describe el equilibrio $C_{D,f} + C_L^0 \leftrightarrow C_{D,b}$ es un modelo de partición:

$$K = \frac{C_{D,b}}{C_L^0 C_{D,f}} \dots\dots\dots (12)$$

Tomando en cuenta la conservación de la masa:

$$C_D^0 = C_{D,b} + C_{D,f} \dots\dots\dots (13)$$

Despejando $C_{D,f}$ de (13)

$$(C_D^0 - C_{D,b}) = C_{D,f} \dots\dots\dots (14)$$

Sustituyendo (14) en (12)

$$K = \frac{C_{D,b}}{C_L^0 C_{D,f}} = \frac{C_{D,b}}{C_L^0 (C_D^0 - C_{D,b})} \dots\dots\dots (15)$$

Despejando $C_{D,b}$ de (15) y dividiendo entre $C_{D,b}$

$$C_{D,b} = C_L^0 K C_D^0 - K C_{D,b} C_L^0 \dots\dots\dots (16)$$

$$\frac{C_{D,b}}{C_{D,b}} = \frac{C_L^0 K C_D^0}{C_{D,b}} - \frac{K C_{D,b} C_L^0}{C_{D,b}} \dots (17)$$

$$1 = \frac{C_L^0 K C_D^0}{C_{D,b}} - K C_L^0 \dots (18)$$

$$1 + C_L^0 K = \frac{C_L^0 K C_D^0}{C_{D,b}} \dots (19)$$

$$(1 + C_L^0 K) C_{D,b} = C_L^0 K C_D^0 \dots (20)$$

$$C_{D,b} = \frac{C_L^0 K C_D^0}{1 + C_L^0 K} \dots (21)$$

Por lo que la ecuación (11) puede ser escrita como la (21).

Derivando (21)

$$\delta C_{D,b} = \frac{(1 + C_L^0 K) K C_D^0 - K (K C_D^0 C_L^0)}{(1 + K C_L^0)^2} = \frac{(1 + C_L^0 K) K C_D^0 C_L^0 - K (K C_D^0 C_L^0) \delta C_L^0}{(1 + K C_L^0)^2} \dots (22)$$

$$\delta C_{D,b} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0 + K^2 C_L^0 \delta C_L^0 C_D^0 - K^2 C_L^0 \delta C_L^0 C_D^0}{(1 + K C_L^0)^2} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1 + K C_L^0)^2} \dots (23)$$

$$\delta C_{D,b} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1 + K C_L^0)^2} \dots (24)$$

Igualando (9) y (24)

$$\delta C_{D,b} = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1 + K C_L^0)^2} = \frac{\delta h_i}{V_{a,i} \Delta H_D} \dots (25)$$

Despejando δh_i de (25)

$$\delta h_i = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1 + K C_L^0)^2} V_{\text{ext}} \Delta H_D \dots\dots\dots (26) \quad (\text{Ref. 19 y 20})$$

La ecuación de ajuste es una ecuación de tipo $f = a x / (1+bx)^2$ (Ref. 21)

Formándose a lo largo de la titulación bicapas mixtas (Ref. 22)

1.4 Referencias:

- 1) PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA. LEHNINGER. 5° edición. Ediciones Omega. Impreso en España. 2009. pg 343.
- 2) Differential Scanning Calorimetry of Bilayer Membrane Phase Transitions. S. M. Ohline, M. L. Campbell, M. T. Turnbull, and S. J. Kohler. Dept of Chemistry, WellesleyCollege.
- 3) Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation. Methods of Biochemical Analysis, Volume 33. Edited by David Glick. 1988 by John Wiley & Sons.
- 4) The role of liposomes in analytical processes Agustina Gomez-Hens, Juan Manuel Fernandez-Romero. Trends in AnalyticalChemistry, Vol. 24, No. 1, 2005.
- 5) Journal of the royal society interface. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. Nelson Monteiro, Albino Martins, Rui L. Reis and Nuno M. Neves. June 11, 2015. 11: 20140459.
- 6) Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine.
- 7) Cosmetologia de Harry. J.B. Wilkinson, R. J. Moore, Marta. Editorial Diaz de Santos. 1990. Pg 702 -703.
- 8) <http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/temas/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/sitioscontaminados/GTZ/E-Clasificacion%20de%20Tensoactivos.pdf>

- 9) Nonionic Surfactants Alkyl Poliglucosides. Surfactant Science Series Volumen 91. Edited by Dieter BalzerHarldLüders. Printed in USA. Pg 8-12.
- 10) Micelles, Theoretical and Applied Aspects. Yoshikiyo Morori. Plenum Press, New York 1992. 1° edition. Pg 41.
- 11) Surfactants. Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry. Cambridge university press. Published 2000. Pg 9.
- 12) Farmacología. Rang y Dale. Elsevier España. Impreso en España. 2008. Pg 226-228.
- 13) http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/biodisponibilidad_4322.pdf
- 14) ATKINS, P.W. "Química física". Ed. Omega Sexta edición (2008)
- 15) Vesicle-Micelle Transformation of Phosphatidylcholine/Octyl- α -D-glucopyranoside Mixtures As Detected with Titration Calorimetry.
- 16) Octyl-, 3-D-Glucopyranoside Partitioning into Lipid Bilayers: Thermodynamics of Binding and Structural Changes of the Bilayer. Markus R. Wenk, Thomas Alt, Anna Seelig, and Joachim Seelig. Biophysical Journal Volume 72 April 1997 1719-1731.
- 17) Vesicle-Micelle Transformation of Phosphatidylcholine/Octyl- α -D-glucopyranoside Mixtures As Detected with Titration Calorimetry.
- 18) Correlation of Membrane/Water Partition Coefficients of Detergents with the Critical Micelle Concentration. H. Heerklotz and J. Seelig. Biophysical Journal Volume 78 May 2000 2435–2440.
- 19) Correlation of Membrane/Water Partition Coefficients of Detergents with the Critical Micelle Concentration. H. Heerklotz and J. Seelig. Biophysical Journal Volume 78 May 2000 2435–2440.
- 20) Liposomes a practical approach. Vladimir P. Torchilin, Volkmar Weissig. Second Edition. Oxford university press. 2003. Pg 347-348.
- 21) Interaction of detergents with lipid vesicles. Jiirgen Lasch Biochimica et Biophysica Acta 1241 (1995) 269-292
- 22) Titration calorimetry of surfactant membrane partitioning and membrane solubilization. H. Heerklotz, J. Seelig. Biochemical et Biophysica Acta 1508 (2000) 69-85.

2 Técnicas experimentales

2.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés), conocida también como Espectroscopia de Foto-correlación o Dispersión Cuasi-Elastica, pertenece a un conjunto de técnicas basadas en el estudio de la interacción radiación-materia.

2.1.1 Fundamentos

Su fundamento teórico se basa en la teoría de dispersión de Rayleigh (para partículas pequeñas y esféricas), la teoría de Mie (partículas esféricas de tamaño superior a la longitud de onda) y la teoría de Stokes-Einstein (la cual no considera la estructura molecular sino las fluctuaciones del índice de refracción). Permite obtener información dinámica de las partículas coloidales que se mueven al azar (movimiento Browniano) como el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico.

El fenómeno físico de dispersión debido a la interacción radiación-materia se explica con el siguiente esquema (fig. 2.1a)

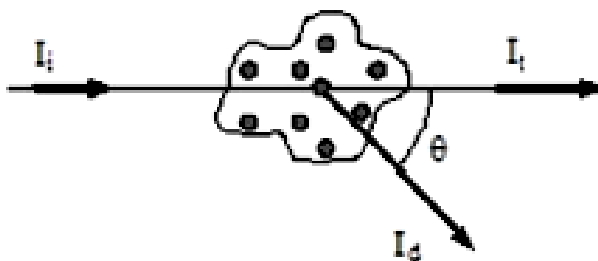


Fig. 2.1a. Donde el plano de dispersión viene dado por la radiación incidente I_i , y la radiación dispersada I_d , ambas relacionadas mediante el ángulo de dispersión θ . La intensidad dispersada por la muestra varía con el tiempo y es ésta la fluctuación que llega al detector.

DLS mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas, esto lo hace iluminando las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada.

Si una pequeña partícula es iluminada por una fuente de luz tal como un láser, la partícula dispersará la luz en todas las direcciones. Si una pantalla se mantiene cercana a la partícula, la pantalla puede ser iluminada por la luz dispersada. Considerando ahora la sustitución de una partícula individual por miles de partículas estacionarias, la pantalla mostrará patrones de manchas, es decir, un patrón que consiste en áreas brillantes y oscuras (esto se muestra gráficamente en la fig. 2.1b) debido a que la luz dispersada al llegar a la pantalla con la misma fase actúa de manera constructiva y forma un área brillante. Las áreas oscuras de las adiciones de fase son mutuamente destructivas y se cancelan una con la otra.

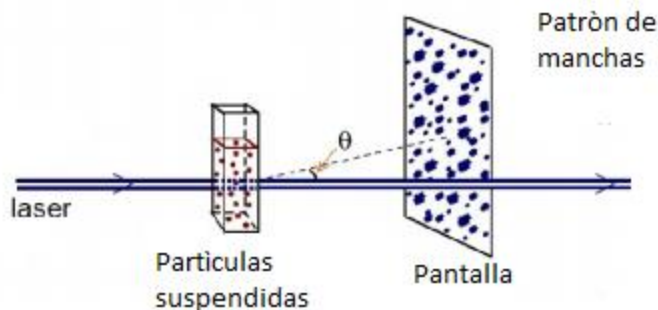


Fig. 2.1b. Patrón de manchas obtenidas por el fenómeno de dispersión de luz.

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

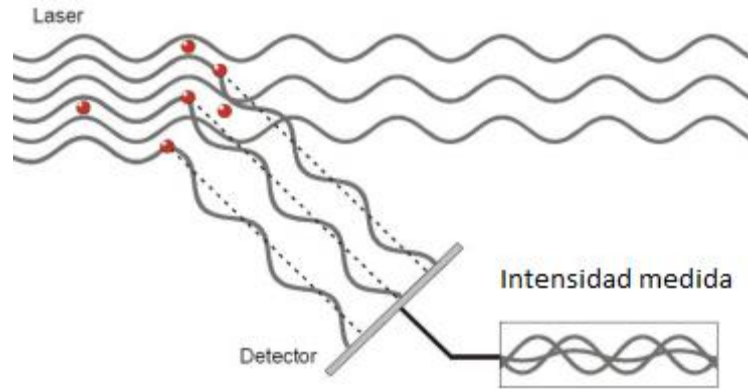


Fig. 2.1c. Luz dispersada incidiendo en el detector.

Para un sistema de partículas que presentan un movimiento Browniano se obtiene un patrón de manchas donde la posición de cada una de ellas cambia constantemente, esto es debido a que la suma de las fases de las partículas en movimiento evoluciona constantemente y forma nuevos patrones. La rapidez a la cual estas fluctuaciones de intensidad ocurren depende del tamaño de las partículas: la fig. 2.1d muestra esquemáticamente las fluctuaciones de intensidad típicas que provienen de partículas grandes y pequeñas.

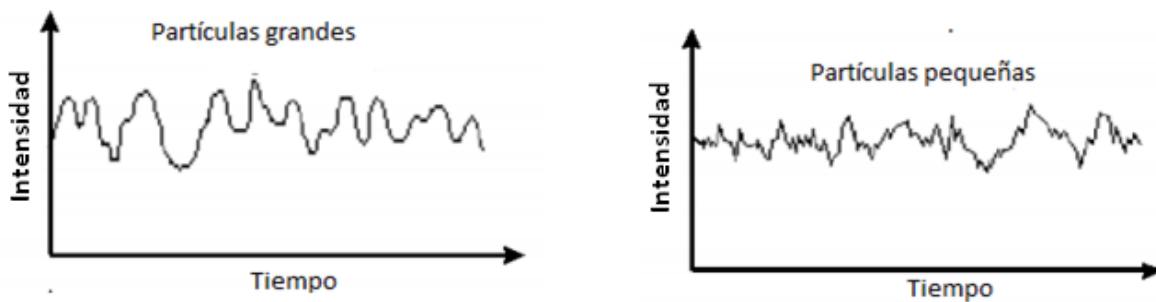


Fig. 2.1d. Intensidad típica de las fluctuaciones de las partículas grandes y pequeñas.

De lo anterior se deduce que las partículas pequeñas causan fluctuaciones de intensidad más rápidamente que las grandes.

El espectro de frecuencias contenido en las fluctuaciones de intensidad provenientes del movimiento Browniano de las partículas, se mide mediante un auto-correlacionador digital.

Un correlacionador es básicamente un comparador de señales. Este es diseñado para medir el grado de similitud entre dos señales o de una señal consigo misma a intervalos de tiempo variables. por lo que la dispersión dinámica de luz, mide las fluctuaciones (resultado del movimiento Browniano) mediante la intensidad de dispersión con respecto al tiempo, para determinar el coeficiente de difusión translacional (D), y el D_h hidrodinámico. La velocidad del movimiento Browniano es definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión translacional (usualmente dado por el símbolo D).

Movimiento Browniano

El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio de las partículas, que se debe a las interacciones (choques) de las moléculas del disolvente y las partículas suspendidas en él. Las partículas más grandes, serán las de menor movimiento Browniano y las partículas más pequeñas colisionarán más con las moléculas del disolvente y por lo tanto, se moverán más rápidamente.

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

$$D_h = \frac{kT}{3\eta\pi D}$$

Donde:

D_h = diámetro hidrodinámico

D = coeficiente de difusión translacional

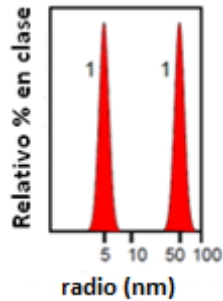
k = constante de Boltzman

T = temperatura absoluta

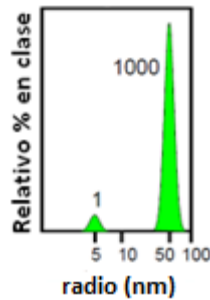
η = viscosidad

Parámetros de distribución: Intensidad, Volumen y Número

Para entender estos conceptos, supóngase que se tiene una muestra que contiene sólo dos tamaños de partícula, 5nm y 50nm, pero con números iguales de cada tamaño de partícula.

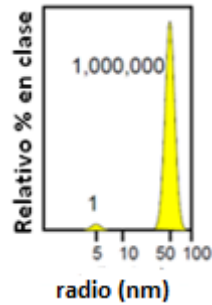


La fig. 2.1e. Muestra los resultados de un número de distribución, con dos picos del mismo tamaño, ya que hay igual número de partículas.



La fig. 2.1f. Muestra el resultado por volumen de distribución. El área del pico para las partículas de 50nm es 1,000 veces mayor que el pico de 5nm (relación 1:1000). Esto es debido a que el volumen de una partícula de 50nm es 1,000 veces más grande que la partícula de 5nm.

$$V = \frac{4}{3} \pi (d/2)^3$$



La fig. 2.1g. Muestra el resultado por intensidad. El área del pico de las partículas de 50nm es ahora 1,000,000 veces más grande que el pico de 5 nm (relación 1: 1,000,000). Esto es porque las partículas más grandes dispersan mucho más la luz que las partículas pequeñas, la intensidad de la dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro (aproximación de Rayleigh).

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

2.1.3 Instrumentación

Configuración óptica de un instrumento de dispersión dinámica de luz.

La fig. 2.1h. muestra un arreglo típico de un sistema de dispersión dinámica de luz y está formado por 6 componentes principales: (1) Un rayo láser que es la fuente de luz que ilumina la muestra contenida en una celda. (2) Para soluciones diluidas la mayor parte del rayo láser pasa a través de la muestra, pero una fracción es dispersada por las partículas de la muestra en un ángulo θ . Un detector (3) es usado para medir la intensidad de luz dispersada en un ángulo de 175° a 90° dependiendo del modelo en particular. La intensidad de la luz dispersada debe estar en el rango específico para que el detector lo pueda medir exitosamente. Si la señal es muy grande el detector puede ser saturado, por lo cual es necesario usar un atenuador (4) para reducir la intensidad del rayo láser y por lo tanto, la intensidad de la luz dispersada. Correlacionador (5) es el dispositivo en el que la señal de Intensidad de

Dispersión que viene del detector, se hace pasar por un tablero de procesamiento de señal digital (compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo consecutivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable). Finalmente, los datos obtenidos son analizados mediante un software y se obtiene el tamaño de partícula (Ref. 1, 2 y 3).

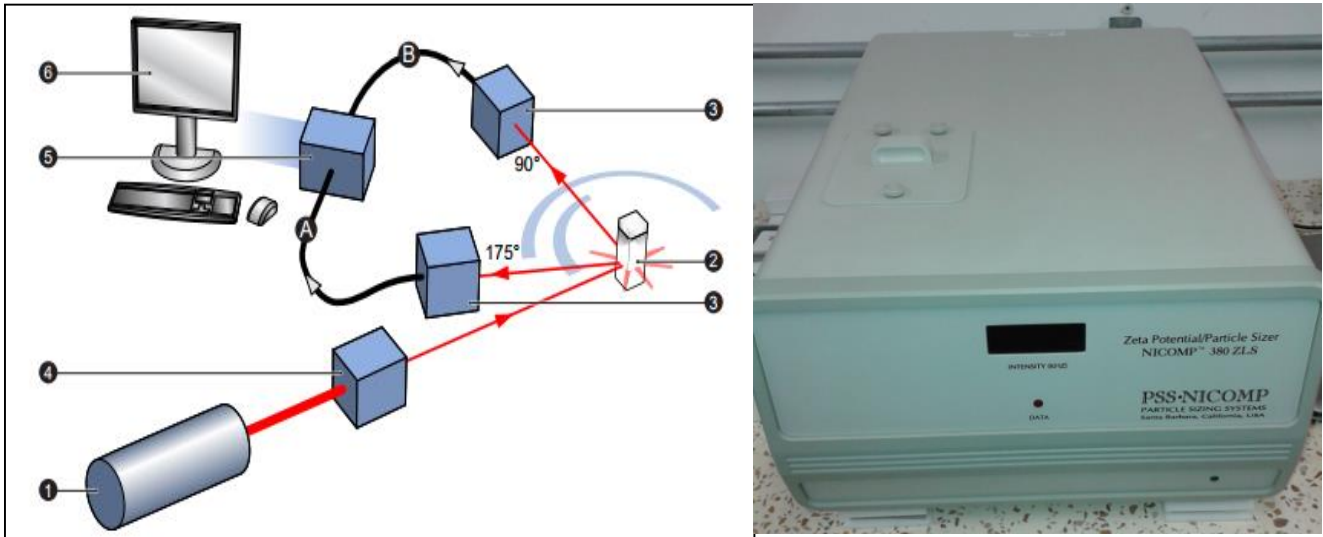


Fig2.1h. Esquema del sistema interno del DLS (izquierda). DLS empleado PSS-NICOMP (derecha).

2.2 Técnicas calorimétricas

2.2.1 Calorimetría Isotérmica de Titulación (por sus siglas en inglés, Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

La calorimetría es una técnica universal para medir el calor ya sea generado o absorbido en interacciones moleculares. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es habitualmente utilizada para estudiar todo tipo de reacciones de unión receptor-ligando.

2.2.1.1 Fundamentos de la técnica e instrumentación

En ITC una jeringa accionada por un motor, controlado por una computadora, contiene una (en este contexto, vesículas lipídicas) que titula el contenido de una celda que contiene "el reactivo" (en este contexto, un tensoactivo). Una representación esquemática de una titulación calorimétrica se muestra en la figura 2.2a. Esta tiene una celda de referencia y una celda de medición (ambas con un volumen de 1.6 - 2 ml) llenas con la misma solución. Una propela agita eficiente con una velocidad angular de alrededor de 300 r.p.m. El inyectante es suministrado en pequeñas alícuotas, típicamente de 5-25 μ l. Como los dos materiales interactúan, el calor absorbido o producido depende de la cantidad de solución añadida y de la naturaleza de las interacciones presentes.

Debido a que las vesículas lipídicas saturan al tensoactivo localizado en la celda, el calor desprendido disminuye hasta mantenerse constante para cada adición; éste es el calor de dilución.

El calorímetro es un sistema adiabático que trabaja en un modo de compensación de potencial, es decir, todos los efectos del calor resultante de la inyección son activamente equilibrados manteniendo la retroalimentación de la celda de referencia y la celda de medición a la misma temperatura. Esto es realizado a través de una medición muy precisa de la diferencia de temperatura entre las dos celdas. La celda de referencia es calentada continuamente con una muy baja potencia ($\sim 20\mu$ w). El aumento de temperatura es bajo (30-60mK/h) y el proceso de mezcla y reacción pueden ser considerados como isotérmico dentro de los límites del experimento. La celda de mezcla está conectada a un segundo calentador, la potencia es controlada por un mecanismo de retroalimentación para eliminar cualquier diferencia de temperatura entre las celdas.. Si el calor se genera o absorbe en la celda de medición, se requiere un cambio en la potencia del segundo calentador para restaurar a una temperatura idéntica las dos celdas. El flujo de calor se mide y se registra como una función del tiempo. El área bajo cada pico es igual al calor total liberado para cada adición (ΔH).

El instrumento es altamente sensible y detecta cambios de temperatura de ~ 1 cal de 10^{-6} K para 1 ml en la celda. Se determina directamente la K de equilibrio y el ΔH para el proceso estudiado, y con esto, se calcula la energía de Gibbs, ΔG , y el cambio de entropía (ΔS). (Ref 4)

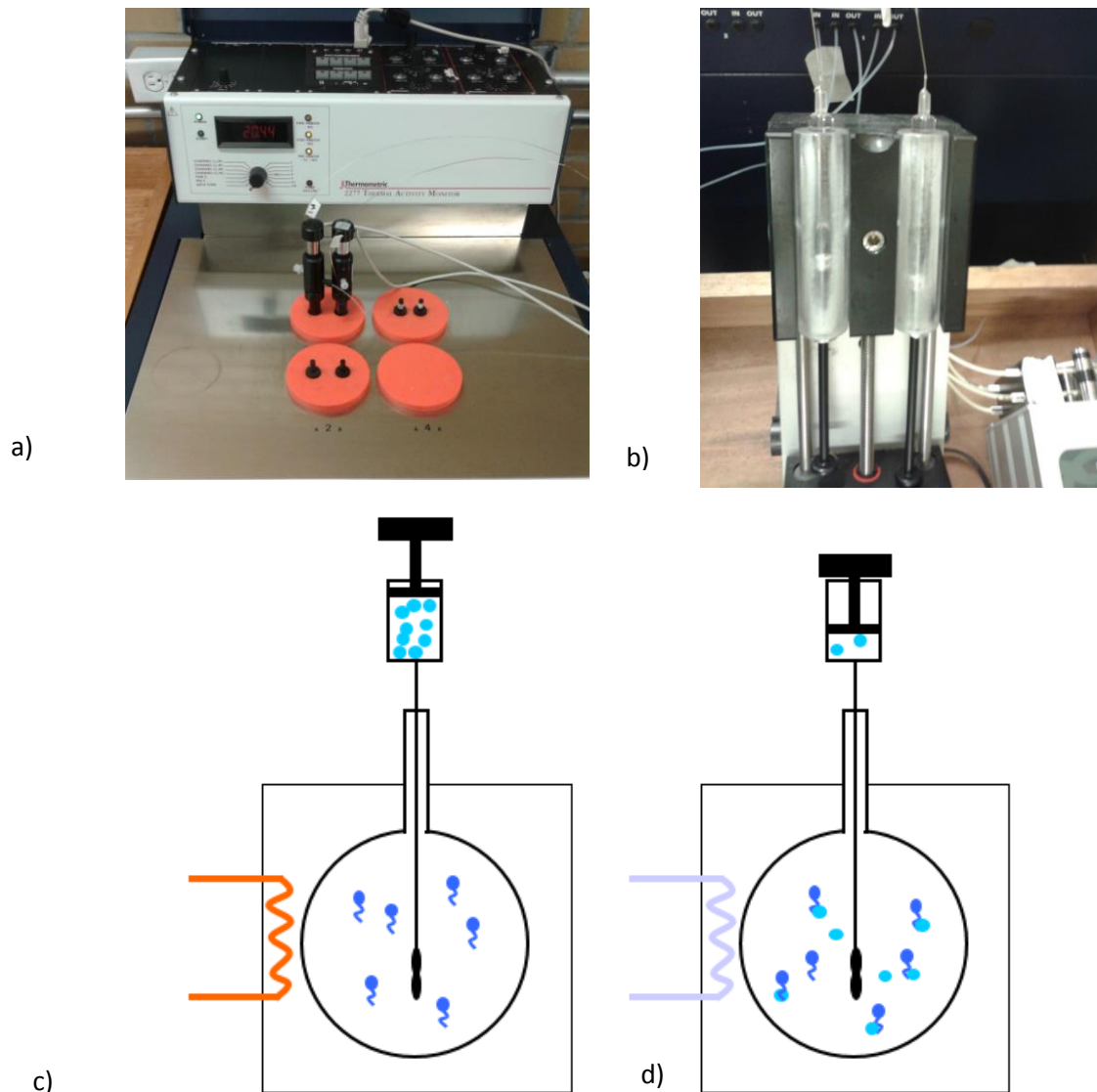


Fig. 2.2a. a) y b), muestran el calorímetro empleado "Thermometric 2277 THERMAL ACTIVITY MONITOR (TAM)", c) y d) muestran la interacción entre el fosfolípido y el tensoactivo.

2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés Differential Scanning Calorimetry DSC)

2.2.2.1 Fundamentos de la técnica

Definición de capacidad térmica

El flujo de calor está dado en unidades de calor, q suministrada por unidad de tiempo. La rapidez de calentamiento es el incremento de temperatura T por unidad de tiempo, t :

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

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

Al dividir el flujo de calor (q/t) entre la velocidad de calentamiento ($\Delta T/t$) tenemos el calor suministrado, dividido entre el aumento de temperatura. La respuesta del sistema al flujo de calor se describe mediante una importante propiedad termodinámica denominada capacidad térmica que es una propiedad extensiva definida mediante la relación

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

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

El valor de la capacidad térmica depende de las condiciones experimentales bajo las cuales se determina. Las condiciones más comunes son volumen constante o presión constante, para las cuales la capacidad térmica se denota mediante C_v y C_p respectivamente, que también pueden denotarse por (Ref. 5):

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

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) monitorea los efectos del calor asociado con las transiciones de fases y las reacciones químicas como una función de la temperatura. En el DSC la diferencia en el flujo de calor de una muestra y una referencia a la misma temperatura, es registrada como una función de la temperatura. La referencia es un material inerte. La temperatura de ambos la muestra y la referencia incrementan a una tasa constante, ya que el DSC trabaja a presión constante, el flujo de calor es equivalente al cambio de entalpía:

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

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

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

Y puede ser positivo o negativo. En un proceso endotérmico, tal como en los sistemas aquí estudiados, el calor es absorbido y por lo tanto, el flujo de calor a la muestra es mayor que el de la referencia, entonces $\Delta dH/dt$ es positivo. Otros procesos endotérmicos incluyen las transiciones en el DNA, desnaturalización de proteínas, deshidratación, reacciones de reducción y algunas reacciones de descomposición. En un proceso exotérmico, tal como la cristalización, algunos procesos de entrecruzamiento, reacciones de oxidación y algunas reacciones de descomposición, el $\Delta dH/dt$ es negativo.

El calorímetro consiste de una celda para la muestra y otra para la referencia mostrado en la figura 2.2b. Ambos están contruidos de platino para permitir una temperatura de operación alta. Bajo cada celda hay una resistencia y un sensor de temperatura. Se hace pasar una corriente eléctrica a las dos resistencias para aumentar la temperatura a la tasa seleccionada. La diferencia en la potencia para las dos celdas, necesaria para mantenerlas a la misma temperatura y es usada para calcular $\Delta H/dt$.

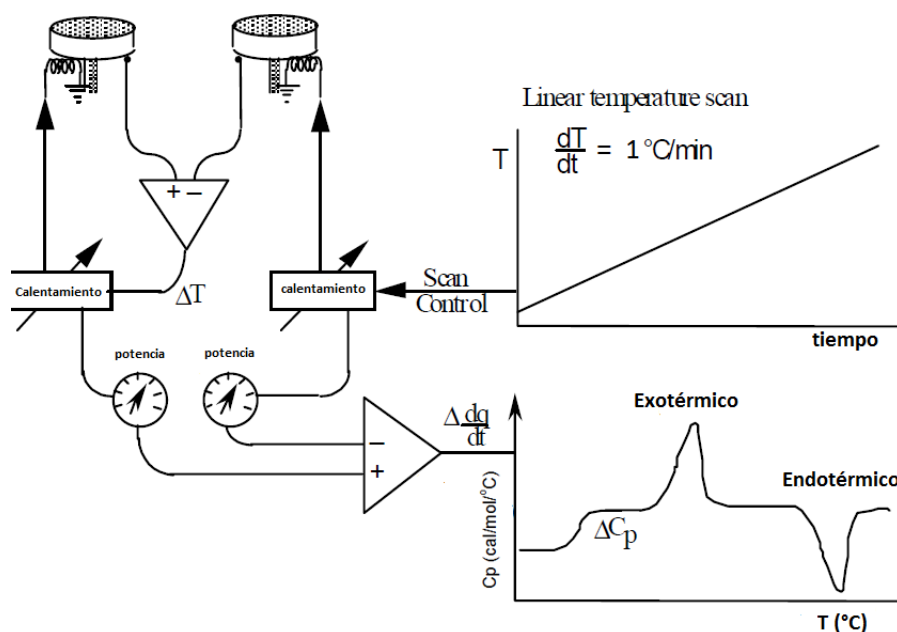


Fig. 2.2b. Diagrama esquemático de un termograma de un DSC.

La área bajo el pico del termograma, por encima de la línea base, da el cambio de entalpía total del proceso:

$$\int \left(\frac{dH}{dt} \right)_{\text{muestra}} dt = \Delta H_{\text{muestra}}$$

Asumiendo que la capacidad térmica de la referencia es constante en el rango de temperatura cubierto por el pico, el $\Delta H_{\text{referencia}}$ se anula porque se toma la integral por encima de la línea base.

La rapidez de barrido es:

$$\text{rapidez de barrido} = \frac{dT}{dt}$$

Usando la regla de la cadena

$$C_p = \left(\frac{dH}{dT} \right) = \frac{dH}{dt} \frac{dt}{dT}$$

Donde dH/dt es el cambio en la línea base del termograma (Ref. 6 y 7)

A través de esta técnica es posible obtener las fases y transiciones de fases de los fosfolípidos (Ref.8).

En las fosfatidilcolinas existen cuatro fases estables: fase L_c o fase sub-gel; $L_{\beta'}$ o fase gel; $P_{\beta'}$ o fase ondulada; fase L_{α} , líquida-cristalina desordenada o fase fluida. Las correspondientes transiciones de fase son: sub-transición, T_s , que corresponde a la transición de la fase sub-gel a la tipo gel; la pre-transición, T_p , que corresponde a la transición de la fase gel a la fase ondulada; la transición principal, T_m , que corresponde al cambio de la fase ondulada a la fase fluida. Una breve descripción de cada una de las transiciones se da a continuación.

Sub-transición (T_s): es una transición meta-estable cuya aparición (pico endotérmico), depende de la historia térmica de la muestra. No aparece en la Fig. 2.2c, pues se requiere incubar la muestra a bajas temperaturas por varios días. Esta transición está asociada con un incremento de desorden en la cadena alifática de los fosfolípidos.

Pre-transición (T_p): esta transición ha estado históricamente asociada con un cambio en el empaquetamiento de los fosfolípidos, aunque modelos recientes sugieren que se debe principalmente a un incremento en la hidratación de la bicapa. La ocurrencia de esta pre-transición depende de la naturaleza de la cabeza del fosfolípido, está presente en las fosfatidilcolinas y en los fosfatidilglicerol, pero no

en las fosfatidiletanolaminas y glucolípidos. Esta transición es muy sensible a perturbaciones en la membrana causadas por fármacos, péptidos o proteínas, aunque todavía existe un debate sobre si esto es debido realmente a la interrupción del orden estructural de la cadena alifática o más bien un cambio en la discordancia en el área de la sección transversal entre el grupo de la cabeza polar y colas alifáticas. (Ref. 9)

Transición principal (T_m): la transición principal es la de mayor entalpía y cooperatividad de las transiciones ya mencionadas. Un gran cambio en el desorden de la membrana y la pérdida de la inclinación de los fosfolípidos acompañan a esta transición. (Ref. 10)

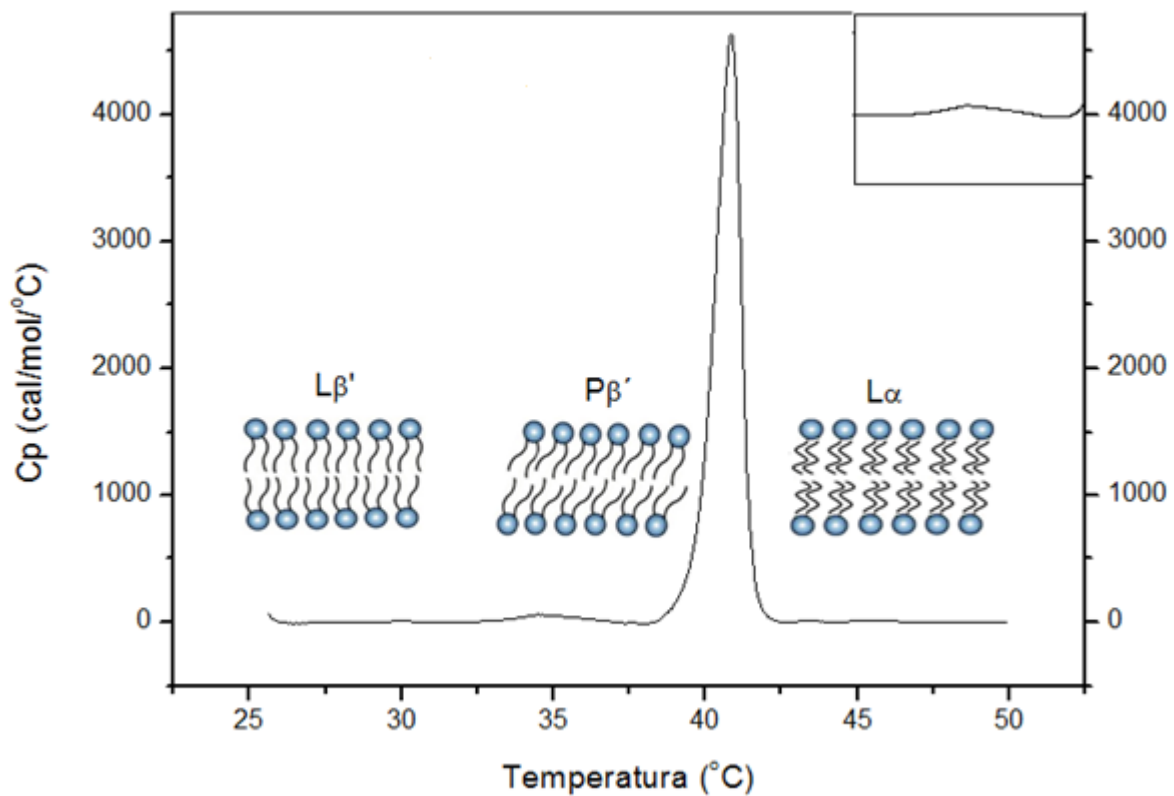


Fig. 2.2c. Termograma de DPPC obtenido en este trabajo. La pre-transición coexisten las fases gel ($L\beta'$) y la fase ondulada ($P\beta'$). En la transición principal coexiste la fase ondulada ($P\beta'$) y la fase líquida ($L\alpha$).

La meta de este experimento es utilizar la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para estudiar las transiciones de fase gel a líquido-cristalino de las bicapas de fosfolípidos

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

Cooperatividad de la transición de fase.

La transición de fase gel a cristal-líquido es altamente cooperativa. En transiciones cooperativas, antes de que se alcance la temperatura de transición calentando, las moléculas comienzan a reorganizarse para pasar a asociarse juntas. La cooperatividad está definida como el ancho de temperatura a media altura de la transición de fase. En otras palabras, las moléculas cooperan juntas en ganar un nuevo movimiento de libertad; cuando una molécula toma energía cinética entonces, para otras moléculas cercanas a ella resultará más fácil agregar energía cinética. Cuando la temperatura se aproxima a la temperatura de transición, T_m , el rango de distancia de esta cooperación incrementa. Cerca de la temperatura de transición de fase, se pueden imaginar islas o dominios de lípidos en una fase más móvil entremezcladas con la fase menos móvil (fase gel). En estas islas o dominios, los movimientos de las moléculas están altamente correlacionados. Estas interacciones correlacionadas ayudan en el cambio repentino de orden en la temperatura de transición de fase. Cuanto mayor sea la cooperatividad, más estrecho es el intervalo de temperatura de la transición de fase.

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

Para una transición de fase de primer orden tal como la transición de gel a líquido-cristal, la temperatura de transición, T_m , se presenta donde la capacidad térmica, C_p , alcanza su valor máximo. El valor del cambio de entalpía (ΔH) para la transición de fase es determinada por la integración del área bajo el pico:

$$\Delta H = \int C_p dT$$

A partir de estos valores, la entropía de la transición de fase es determinada:

$$\Delta S = \Delta H / T_m$$

El análisis de ΔH , ΔS y T_m muestra los efectos de una modificación estructural (por ejemplo la longitud de la cadena) en la termodinámica de la transición de fase. Sin embargo, a diferencia de la transición de fase (fusión) de cristal a líquido de un simple compuesto orgánico, la transición de fase en la bicapa implica algo más que el estado inicial y final. En efecto, los estados intermediarios son formados durante la transición y un modelo de dos estados no es necesario para fosfolípidos en Liposomas. Estos estados intermediarios resultan de la formación de dominios (ej. desorden, áreas móviles dentro de la fase gel) y se deben al movimiento lateral de los fosfolípidos dentro de la bicapa. (Ref. 11)

2.2.2.2 Instrumentación

A continuación se muestra el equipo que se utilizó, el cual consiste en un micro-calorímetro modelo VP-DSC de Microcal Incorporated. En la fig.2.2e y fig. 2.2f se muestra el DSC empleado y las condiciones del experimento respectivamente.



Fig. 2.2e. Condiciones experimental en las cuales se llevó acabo los experimentos para el estudio de las transiciones de fase de las vesículas lipídicas.



Fig. 2.2f. Fotografía del DSC VP-DSC, del fabricante General Electric ®.

2.3 Técnicas de microscopía electrónica

Un microscopio puede ser definido como un instrumento que usa uno o varios lentes para formar una imagen ampliada. El término microscopio viene del griego "mikros"= pequeño; y "skopos" = mirar a. Los microscopios electrónicos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de onda electromagnética empleada, dependiendo de si es transmitida o no a través de la muestra. En la microscopía de transmisión TEM (Transmission Electron Microscopy, por sus siglas en inglés) la onda electromagnética que pasa a través de la muestra es diferencialmente refractada y absorbida. En el *microscopio* electrónico de transmisión la fuente de iluminación es un haz de electrones que atraviesa a la muestra. El haz de electrones puede también incidir sobre la superficie de la muestra causando cambios de energía en la muestra. Estos cambios son detectados y analizados para dar una imagen de la muestra. Este último tipo de microscopio es llamado SEM (Scanning Electron Microscope, por sus siglas en inglés). Ambos tipos de microscopios se muestran esquemáticamente en la fig. 2.3a.

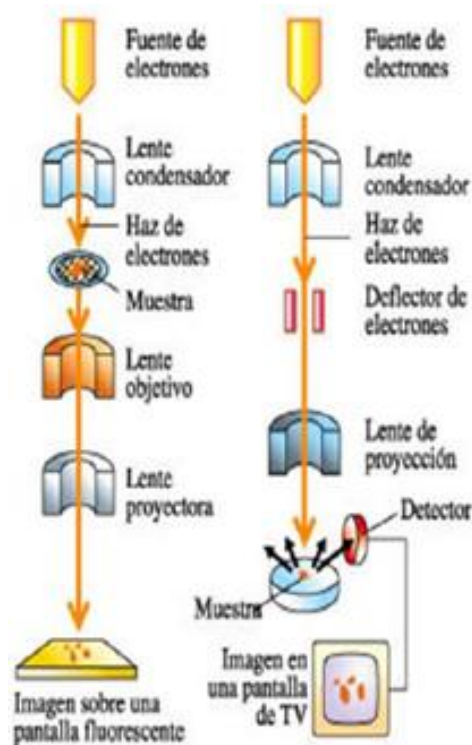


Fig. 2.3a. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión (izquierda) y microscopio electrónico de barrido (derecha).

3.1 Fundamentos

Propiedades del haz de electrones

La microscopia está basada en el uso de un haz de electrones que interactúa con la materia. Los electrones son partículas elementales con carga negativa. Estas partículas fueron descubiertas por Thompson, quien dedujo que los rayos catódicos consisten de partículas cargadas negativamente (corpúsculos) que eran constituyentes del átomo y 1000 veces más pequeño que el átomo de hidrógeno.

La posibilidad para desarrollar un microscopio que utiliza electrones como fuente de iluminación comenzó en 1924, cuando De Broglie postuló el dualismo onda-partícula según el cual toda la materia en movimiento tiene propiedades de onda, cuya longitud de onda λ viene relacionada con el momentum por :

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv}$$

Donde:

h es la constante de Planck = 6.626×10^{-34} Js; m es la masa; y v es la velocidad.

Esto significa que los electrones acelerados actúan también como ondas. La energía de los electrones acelerados es igual a su energía cinética.

$$E = eV = m_0v^2 / 2$$

Donde:

V es el Voltaje de aceleración; e es la carga elemental = 1.602×10^{-19} C; m_0 es la masa del electrón 9.109×10^{-31} kg y v es la velocidad del electrón.

Estas ecuaciones son combinadas para calcular la longitud de onda de un electrón con una cierta energía:

$$p = m_0v = (2m_0eV)^{1/2}$$

$$\lambda = h / (2m_0eV)^{1/2} \quad (\approx 1.22 / V^{1/2} \text{ nm})$$

En los voltajes de aceleración utilizados en TEM y SEM, los efectos relativistas han de tenerse en cuenta de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\lambda = h / [2m_0eV (1 + eV/2m_0c^2)]^{1/2}$$

Donde:

m_0 es la masa del electrón en reposo = 9.109×10^{-31} kg y c es la velocidad de la luz en el vacío = 2.998×10^8 m/s.

Resolución

La resolución de un microscopio, definido como la habilidad de distinguir dos objetos separados uno del otro,

La resolución es el más fino detalle que se puede distinguir en una imagen. El poder de resolución de un microscopio es bastante diferente de su amplificación. Se puede ampliar una fotografía indefinidamente usando lentes más poderosos, pero la imagen puede desdibujarse y ser ilegible. Por lo tanto, incrementando la amplificación no mejora la resolución. La separación mínima (d) que puede ser resuelta con cualquier tipo de microscopio está dada por la fórmula:

$$d = \frac{\lambda}{2\text{sen}\theta}$$

Donde n es el índice de refracción (el cual es 1 en el vacío de un microscopio electrónico) y λ es la longitud de onda, θ es el semi-ángulo de colección de los lentes de amplificación. Dado que la resolución y d son inversamente proporcionales, esta fórmula sugiere que el camino para mejorar la resolución es usar longitudes de onda más cortas y medios con índices de refracción grandes. SEM y TEM emplean estos principios pero usando longitudes de onda extremadamente pequeñas de electrones acelerados para formar imágenes de alta resolución. (Ref. 12).

Ondas Coherentes e Incoherentes

Las ondas de los electrones en el haz pueden ser coherentes o incoherentes. Las ondas que tienen la misma longitud de onda y están en fase entre ellas son coherentes. En contraste, haces compuestos de ondas que tienen diferentes longitudes o no están en fase son llamadas incoherentes. Los electrones acelerados a una cierta energía tienen la misma longitud de onda. La generación de un haz de electrones coherente es un importante desafío en el diseño de microscopios electrónicos modernos. Después de interactuar con la muestra, las ondas de electrones pueden formar a la vez haces coherente e incoherentes, los cuales interactúan entre sí produciendo tanto interferencias constructivas como destructivas que pueden dar paso a la extinción de las ondas como se muestra en la fig. 2.3b.

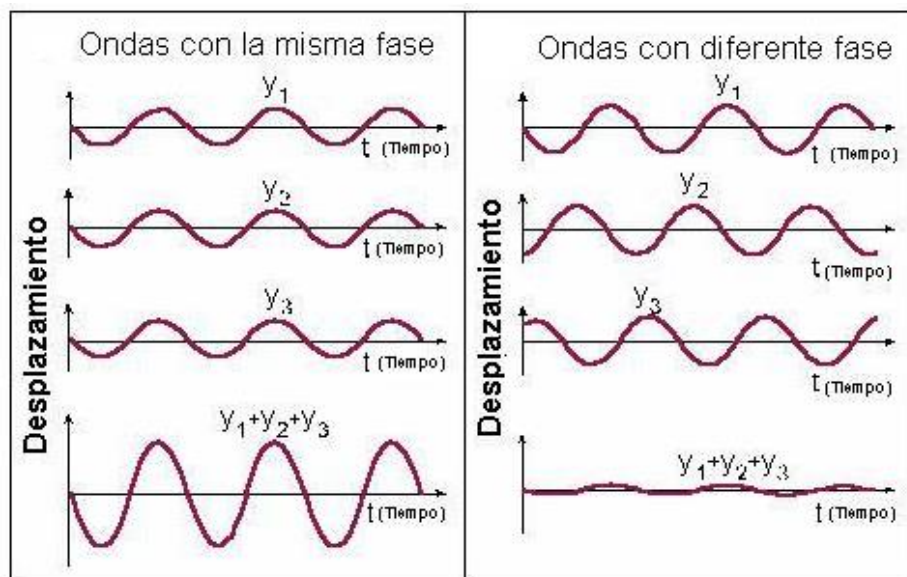


Fig. 2.3b Ondas coherentes e incoherentes

Interacción materia-electrón

Cuando un electrón se encuentra con un material, diferentes interacciones producen una multitud de señales. Los diferentes tipos de interacciones muestra-electrón son la base de los métodos de microscopía electrónica. Los efectos pueden ser clasificados en dos tipos: interacciones elásticas e inelásticas.

En las interacciones elásticas no se trasfiere energía del electrón a la muestra y cuando el electrón sale de la muestra, éste conserva su energía ($E_{el} = E_0$). Este es el caso del paso del electrón al atravesar la muestra dejando a la muestra en la dirección del haz incidente. En muestras delgadas, estas señales son aprovechadas o utilizadas en la técnica TEM, mientras que en muestras gruesas los electrones retro-dispersados son las principales señales elásticas utilizadas en SEM como se muestra en la fig. 2.3c.

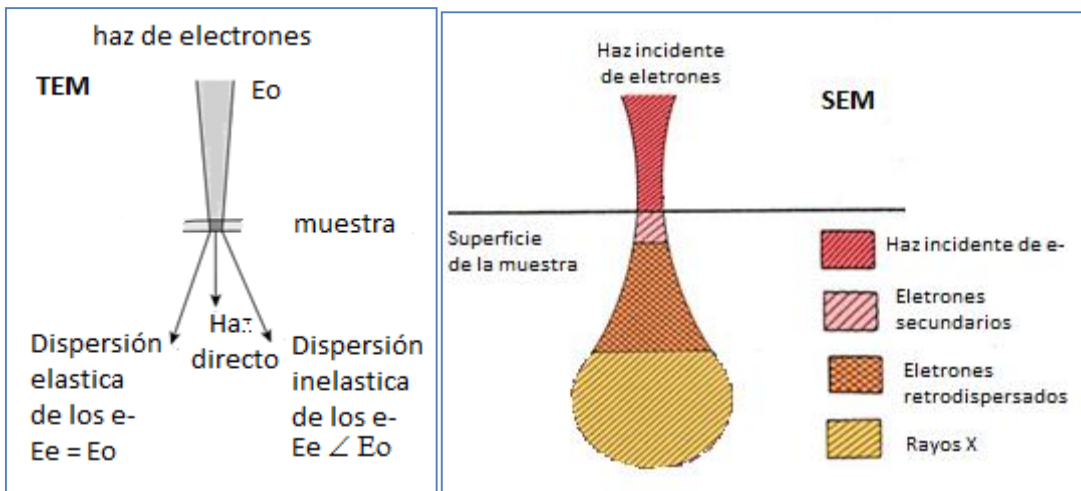


Fig.2.3c. En las interacciones inelásticas, una cantidad de energía se transfiere de los electrones incidentes a la muestra, causando diferentes señales tales como electrones secundarios o retro-dispersados.

La fig. 2.3d. muestra el espectro de la energía del electrón de varias señales producidas durante la interacción de un haz de electrones sobre la muestra. Los picos de baja energía, tal como el pico grande de electrones secundarios, corresponden a la interacción inelástica; que los picos de alta energía corresponden a los casos donde los electrones primarios no pierden energía, o para ser más precisos, pierden una cantidad despreciable de energía mientras que la distribución de los electrones los picos de alta energía. Las señales producidas por las señales de la interacción electrón materias son ampliamente utilizadas en los métodos de microscopia electrónica analítica.

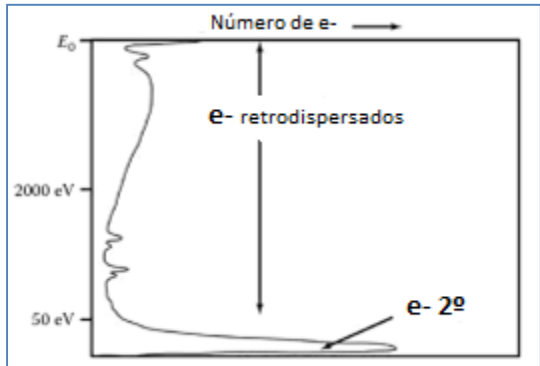


Fig. 2.3d. Espectro de la energía del electrón de varias señales producidas durante la interacción de un haz de electrones sobre la muestra.

El volumen de material afectado por el haz de electrones depende de muchos factores. El volumen de la interacción es controlada por la pérdida de energía a través de interacciones inelásticas y la pérdida de electrones o de retro-dispersión a través de interacciones esencialmente elásticas. Los factores que controlan la profundidad de la penetración de los electrones y el volumen de interacción son; la magnitud de la corriente, la aceleración del haz, y así como el número atómico promedio de la muestra. El volumen de excitación resultante es una región en forma semiesférica de jarra con el cuello de la jarra en la superficie de la muestra fig. 2.3e. El haz de electrones incidente se dispersa en la muestra, tanto elásticamente y de manera inelástica:

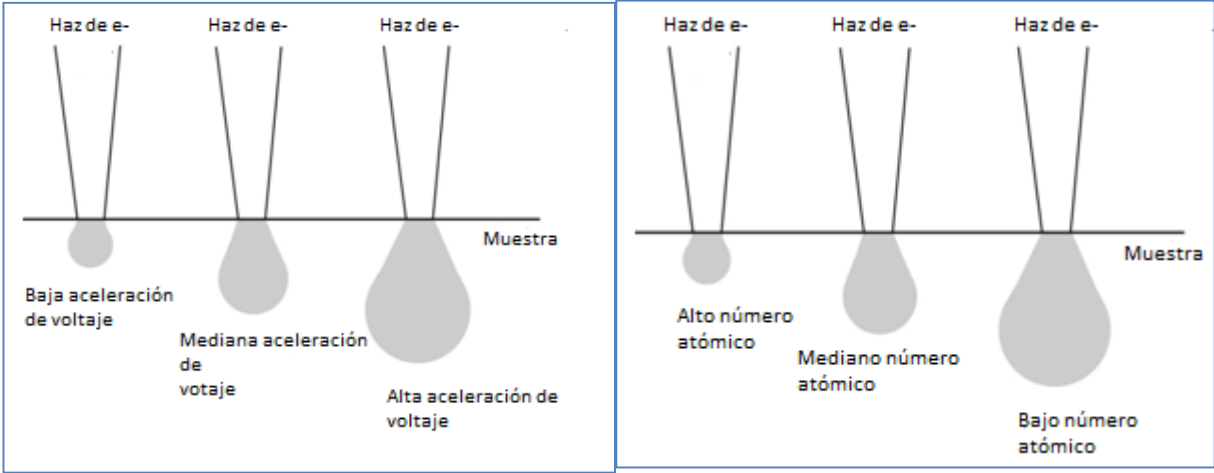


Fig. 2.3e. Volumen de material afectado por el haz de electrones.

INTERACCIONES ELASTICAS

Dispersión incoherente, la señal electrón dispersiva

Cuando un electrón penetra en la nube de electrones de un átomo es atraído por el potencial positivo del núcleo desviando su camino hacia el núcleo. La fuerza de coulomb se define como:

$$F = Q_1Q_2 / 4\pi\epsilon_0r^2$$

Con r siendo la distancia entre las cargas (Q_1) y (Q_2) y ϵ_0 la constante dieléctrica. Cuanto más se acerca el electrón al núcleo, mayor es F y por consiguiente el ángulo de dispersión también.

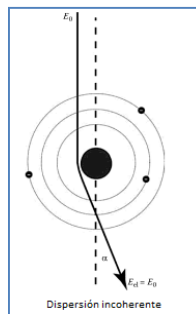


Fig. 2.3g. Dispersión incoherente entre el núcleo de un átomo y un electrón primario

La microscopía electrónica de Transmisión utiliza la dispersión elástica, la cual es relativamente fuerte.(Ref. 13). La imagen aumentada obtenida de la muestra se tiene utilizando los electrones primarios que la atraviesan.

Electrones retro-dispersados

Principalmente análisis químico

Electrones de alta energía, la señal depende del número atómico.

En algunos casos, incluso en la retro-dispersión completa, puede ocurrir en una interacción individual. En las muestras gruesas, muchos electrones incidentes

sufren una serie de este tipo de eventos elásticos que causa que se dispersen de nuevo fuera de la muestra fig. 2.3h.

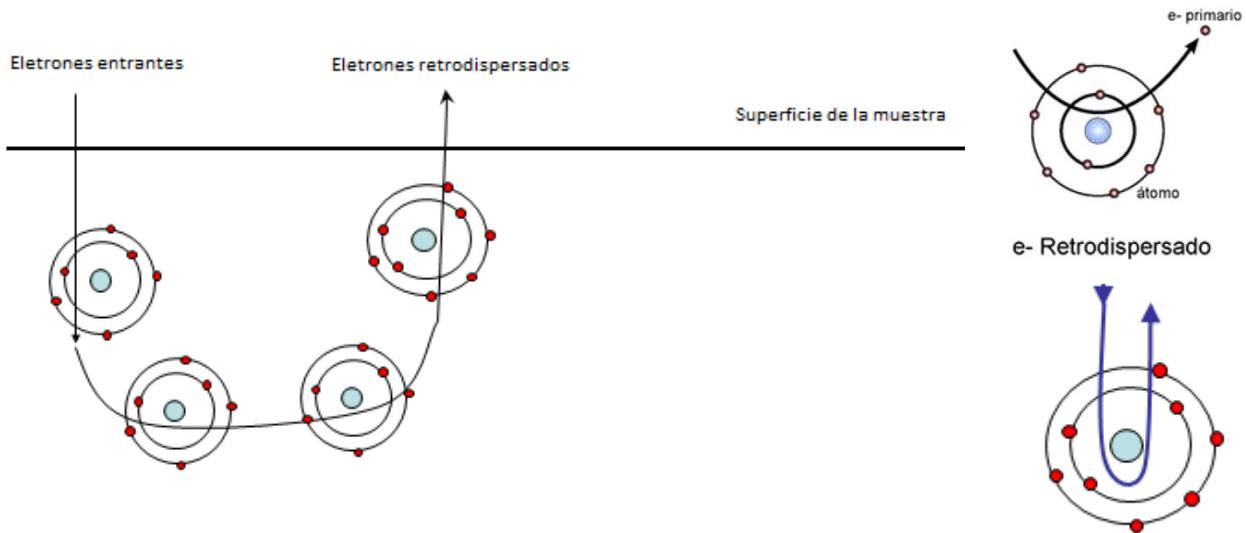


Fig. 2.3h. En esta figura se muestran los electrones retro -dispersados son electrones primarios de alta energía que sufren una dispersión angular grande ($> 90^\circ$) y re-emergen de la superficie de entrada de la muestra.

Eventos de retro-dispersión individuales son generalmente elásticos, donde una cantidad insignificante de la energía se pierde por los electrones primarios en el proceso. La mayoría de estos tienen energías ligeramente inferior al haz de electrones primario, E_0 , pero pueden tener energías tan bajas como ~ 50 eV. Debido a su dependencia de la carga, la fuerza F con el que un átomo atrae un electrón, es más fuerte para los átomos con cargas más positivos. Así, la fuerza de Coulomb aumenta con el aumento de número atómico Z del elemento respectivo. Por lo tanto, la fracción de electrones del haz de retro-dispersión de una muestra (η) depende básicamente de número atómico medio de la muestra, Z fig2.3 i. Sin embargo, en muestras gruesas se debe tener en cuenta que un electrón que ha sufrido dispersión inelástica puede escapar posteriormente a la superficie de la muestra como los electrones retro-dispersados y, por lo tanto, la energía de un electrones retro-dispersados depende del número de interacciones a las que se ha sometido antes de escapar de la superficie de la muestra.

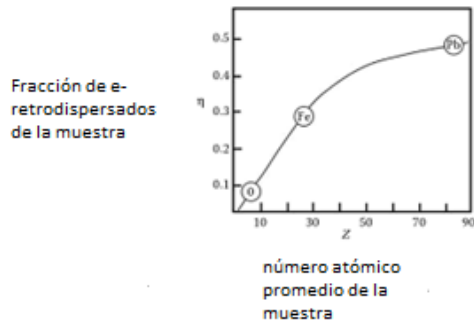


Fig. 2.3i. Relación entre la fracción de e⁻ retrodispersados y el número atómico.

Electrones Transmitidos

Dispersión coherente, la señal de difracción de electrones (ED)

Cuando los electrones se encuentran dispersos por los átomos en un haz regular, ocurre el fenómeno de dispersión elástica colectiva, conocido como difracción de electrones (ED). La onda entrante de electrones interactúan con los átomos, y las ondas secundarias se generan las cuales interfieren unas con otras. Esto ocurre ya sea de forma constructiva (reforzando ciertos ángulos de dispersión generando haces difractados) o destructiva (extinción de haces) que da lugar a un patrón de difracción (fig.2.3b).

La Microscopía electrónica de transmisión (TEM) utiliza los electrones transmitidos a través una fina muestra iluminada por un haz de electrones de alta energía para construir una imagen o un patrón de difracción (DP). De esta manera son «electrón transparente»; es decir, suficientes electrones deben ser transmitidos de manera que la intensidad caiga sobre la pantalla de un tubo de rayos catódicos (CRT) o detector de electrones adecuado.(Ref.14)

Para que tenga lugar la formación de la imagen, debe existir un **contraste** mínimo (surge debido a la dispersión del haz incidente pro la muestra) o variación de intensidad entre zonas próximas a la que se quiere observar. El comportamiento ondulatorio de los electrones permite observar variaciones tanto **encontraste de amplitud** (dispersión elástica incoherente) como en **contraste de fase** (la imagen se forma con más de un haz) de onda al atravesar la muestra y ambos tipos de variación dan lugar al contraste en la imagen. En las imágenes de contraste de

amplitud se obtiene imágenes de campo claro o campo oscuro, seleccionando mediante diafragmas o aperturas, el haz directo o los haces dispersados, respectivamente (Ref.15). Fig. 2.3j.

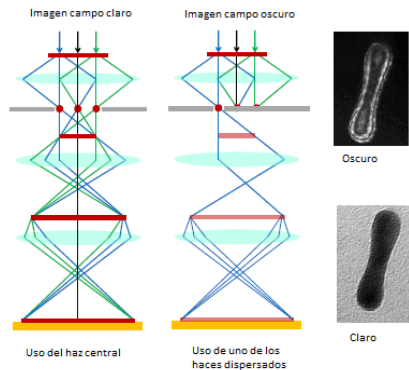


Fig. 2.3j. Imágenes de campo claro (izquierda) y campo oscuro (derecha) que se pueden obtener por la técnica TEM.

La imagen bidimensional formada en una pantalla fosforescente, la cual transforma la energía de los electrones que chocan contra ella, en luz (Ref.16) .La nitidez de un área particular de la imagen es proporcional al número de electrones que son transmitidos a través de la muestra (Ref.17).

INTERACCIONES INELASTICAS

La mayoría de los electrones del haz incidente siguen trayectorias complicadas a través del material de la muestra, la pérdida de energía a medida que interactúan con los átomos de muestra producen un número de interacciones. Varios efectos de interacción debido al bombardeo de electrones salen de la muestra y algunos, como el calentamiento de la muestra, permanecer dentro de la muestra

Los electrones secundarios

Son principalmente para analizar topografía, son electrones de baja energía, se obtiene alta resolución, y la señal depende de la curvatura del haz.

Los electrones secundarios se producen por interacciones inelásticos de electrones

incidentes de alta energía con electrones de valencia de los átomos en la muestra que causan la expulsión de los electrones de los átomos fig.2.3k, que se puede mover hacia la superficie de la muestra a través de colisiones elásticas e inelásticas hasta que alcanza el superficie, escapando si su energía excede la función de la superficie de trabajo, E_w . La región más fuerte en el espectro de energía de los electrones es debida a los electrones secundarios (SE), que se definen como los emitidos con energías de menos de 50 eV (fig. 2.3e).

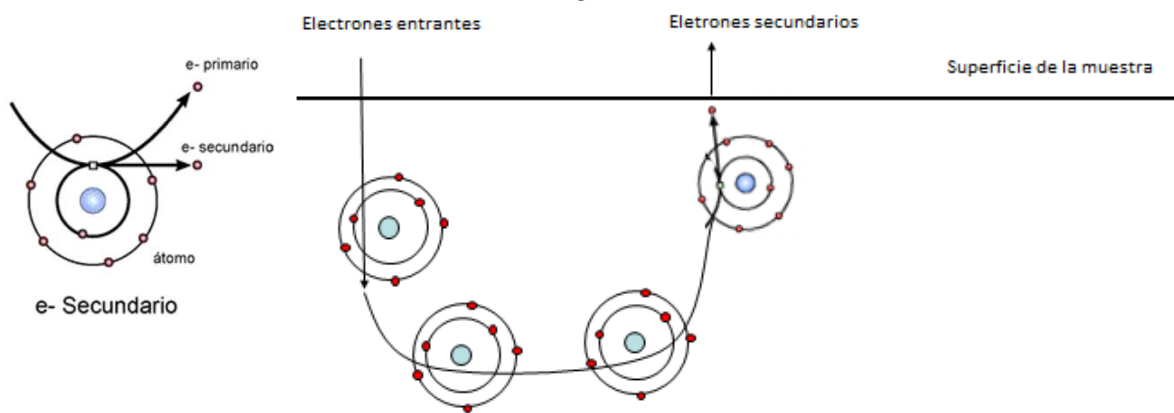


Fig.2.3k. Esquema de la trayectoria de los electrones secundarios a través de la muestra a analizar.

La longitud del camino libre medio de los electrones secundarios en muchos materiales es de $\sim 1 \text{ nm}$ (10 \AA). Aunque los electrones se generan en toda la región excitada por el haz incidente, sólo los electrones que se originan menos de 1 nm de profundidad en la muestra son capaces de escapar dando lugar a un pequeño volumen de producción. Por lo tanto, la resolución usando en SE es efectivamente el mismo que el tamaño del haz de electrones. La poca profundidad de la producción de electrones secundarios detectados los hace muy sensible a la topografía y se utilizan para la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Ref.18).

2.3.2 Instrumentación

A continuación se muestran los equipos que se utilizaron, los cuales son: Microscopio Electrónico multifuncional (SEM y TEM) OXFORD (izquierda) fig.2.2e y el microscopio JEOL JSM-35CF Japonés (derecha) fig. 2.2f.



Fig. 2.2e y 2.2f. La muestra a analizar, se colocó en un porta muestras, se le seca a temperatura (evitando que tenga contacto directo con el ambiente) $\sim 25^{\circ}\text{C}$, posteriormente se le recubre con oro. Esto aplica para SEM y TEM, en tanto para analizar SEM se pide que se analice por electrones retro-dispersados y para TEM se analizan por campo claro. La potencia varía de 10 a 20 KV, con una resolución de $10\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m}$ - 200nm .

2.4 Referencias

- 1) A Basic Guide to Particle Characterization/ MALVERN (manual)
- 2) Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes (<http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/dls.pdf>)
- 3) Introduction to Dynamic Light Scattering DLS (www.horiba.com/fileadmin/.../TE012_V2.pdf)
- 4) Titration calorimetry of surfactant membrane partitioning and membranesolubilization. H. Heerklotz, J. Seelig. *Biochimica et Biophysica Acta* 1508 (2000) 69,85.
- 5) Engel, T. ; Reid, P. *Química Física*. Pearson Addison Wesley. 2006.
- 6) *Differential Scanning Calorimetry; First and Second Order Transitions in Polymers*
- 7) <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed078p1251>

- 8) Kranenburg M, Smit B, 2005, Phase behavior of model lipid bilayers, J. Phys. Chem. B, 109, 6553-6563.
- 9) Le Bihan T, Pezolet M, 1998, Study of the structure and phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine by infrared spectroscopy: characterization of the pretransition and subtransition, Chem. Phys. Lipids, 94, 13-33.
- 10) Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias químicas. Miguel Angel Magaña Fuentes.
- 11) Differential Scanning Calorimetry of Bilayer Membrane Phase Transitions
- 12) <http://hypertextbook.com/facts/2000/IlyaSherman.shtml>
- 13) Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope. R.F. Egerton. Third Edition. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 1996. Pg 16
- 14) Structural and Chemical Properties: Transmission Electron Microscopy. R Marassi and F Nobili, Università di Camerino, Camerino, Italy & 2009 Elsevier B.V. pg 1.
- 15) Tesis doctoral. Fabricación de Liposomas y de capsulas poliméricas. Universidad de Complutense de Madrid. Marta Ruano Aldea. 2013. Pg 118-119.
- 16) INTRODUCCIÓN A LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA. Caribay Urbina. Caracas, Octubre 1997. Pg 16.
- 17) <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm>
- 18) Handbook of Physics in Medicine and Biology. Robert Splinter CRC Press. 2010. Pg 40-1 a 40-10

3 Material y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Fosfolípido

L- α -PHOSPHATIDYLCHOLINE, DIPALMITOYL (DPPC). $C_{40}H_{80}NO_8P$. Masa molar 734.039 g mol⁻¹. Pureza 99%. Almacenamiento a -20°C. Temperatura de transición 40°C, CMC 4.6x10⁻⁷ mM. Punto de fusión 225-235 °C. (Ref. 1)

3.1.2 Tensoactivo

Nonyl- β -glucopyranoside (NGP). $C_{15}H_{30}O_6$. Masa molar 306.40. Pureza 97%. Almacenamiento a -20°C. Tensoactivo no iónico. CMC 6.5 mM. Punto de fusión 176.39°C. (Ref. 2)

3.1.3 Fármaco

Ibuprofeno (IBU). $C_{13}H_{18}O_2$. Masa molar 206.28 g mol⁻¹. Pureza 98%. Punto de fusión 75-77 °C. Solubilidad en agua 21 mg L⁻¹. (Ref. 3)

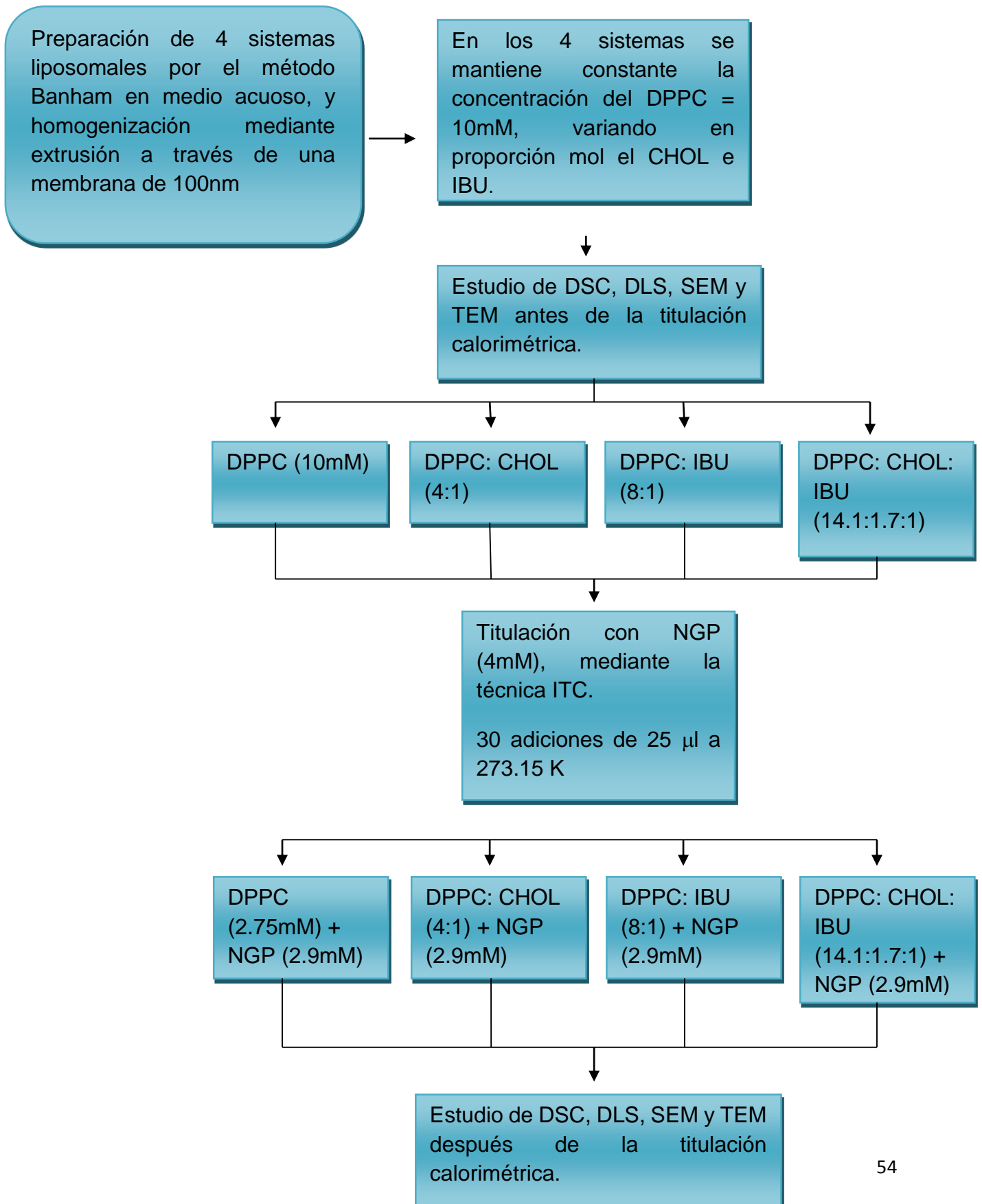
3.1.4 Colesterol

$C_{27}H_{46}O$. Masa molar 386.65 g mol⁻¹. Pureza 98%. Punto de fusión 148.5 °C. Solubilidad en agua .094 mg L⁻¹, soluble moderadamente en alcohol. (Ref. 4)

3.1.5 Otros materiales

Cloruro de metileno (CH₂Cl₂) grado QP, agua des-ionizada.

3.2 Metodología

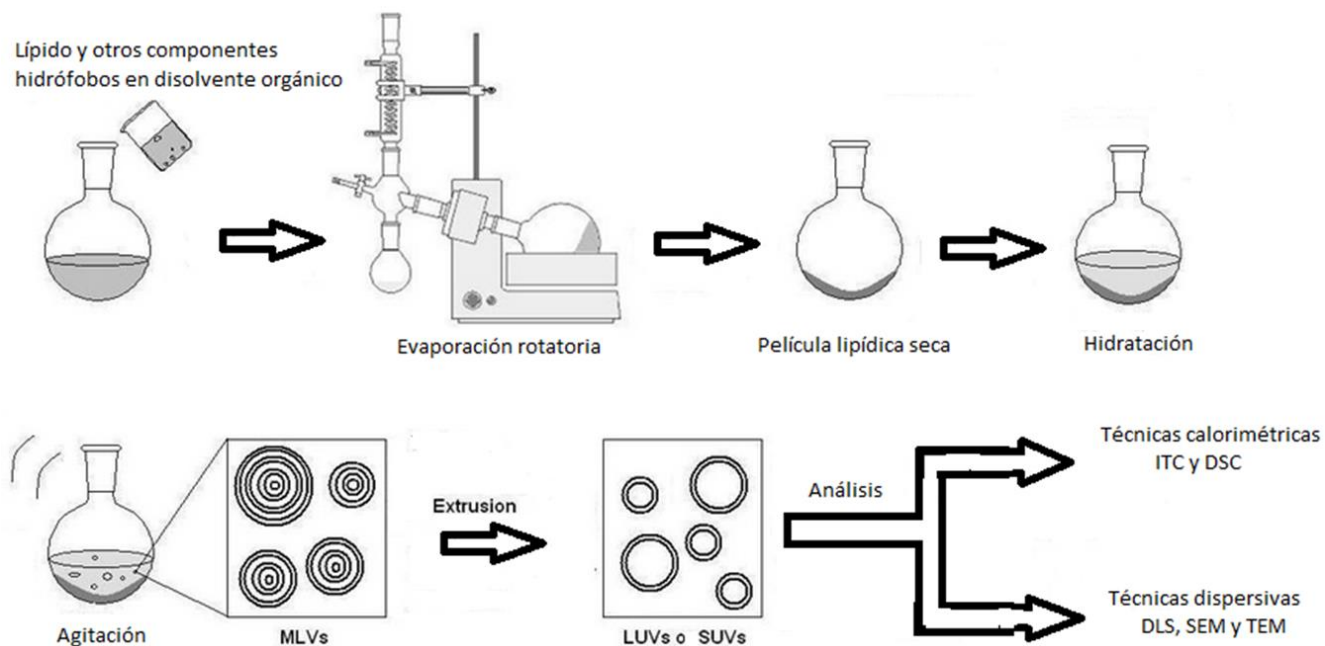


3.2.1 Preparación de liposomas por el método Banham y homogenización por extrusión (Ref. 5)

- 1) Pesar la cantidad necesaria de DPPC, Chol, OGP y Fármaco, en la proporción molar a la concentración deseada, en un matraz de bola de 50 ml (tarado), seco y limpio.
- 2) Adicionar el Cl_2CH_2 lo necesario para disolver los componentes que se encuentran dentro del matraz.
- 3) Colocar el matraz en la boca del rota-vapor a 7 revoluciones durante 5 minutos, sin sumergir el matraz en el baño de agua. Esto es con el objetivo de que los componentes se disuelvan en el Cl_2CH_2 uniformemente.
- 4) Pasados los 5 minutos de agitación, evaporar el disolvente a una temperatura de 55°C con ayuda de una bomba de ultra vacío, por dos ciclos (cada ciclo consiste en dos horas de secado) con 15 minutos de descanso entre ciclo, cuidar que la manguera que alimenta con agua fría al condensador, cuente con un baño re-circulante $\sim 10^\circ\text{C}$, para evitar que el Cl_2CH_2 llegue a la bomba y/o cause un accidente.
- 5) Una vez concluido el secado al vacío, se hidrata la película con H_2O des-ionizada a temperatura ambiente (filtrar el agua con una membrana de PDV $0.2\ \mu\text{m}$), para ajustar la concentración (se consigue un pH 7.2 para todos los sistemas).
- 6) Sumergir el matraz a 55°C durante 30 minutos y a 11 rpm, para conseguir que se hidrate la película.
- 7) Una vez concluido el paso anterior, se retira el matraz del rota-vapor, colocándole el tapón esmerilado sin ejercer mucha presión al cerrarlo. Para asegurar que la película fue desprendida de las paredes del matraz, se somete a 2 minutos en el vortex.
- 8) Se lleva la suspensión de los MLVs a extrudir. Esto se hace en un extrusor que cuenta con un baño el cual se ajusta a 55°C , se hace pasar la suspensión de vesículas a través de la membrana de celulosa ($0.1\ \mu\text{m}$ o 100nm) la cual

se encuentra dentro del extrusor, extrudiendo la suspensión al menos 15 veces,

- 9) Una vez terminado el proceso de homogenización, está listo para ser analizado fisicoquímicamente. Se almacena a temperatura ambiente.



3.3 Referencias

- 1) https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/SAFC/General_Information/1/dppc-eqpd.pdf
- 2) <http://www.scbt.com/datasheet-281084-n-nonyl-d-glucopyranoside.html>
- 3) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ibuprofen#section=Top>
- 4) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholesterol#section=Top>
- 5) Liposomes. Practical approach. Vladinir P. Torchilin. Second Edition. Oxford University press. Pg 347-348.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y TITULACIÓN DE LIPOSOMAS CON MONOMEROS DE NGP

4.0 Monitoreo de la estabilidad del tamaño de partícula de los sistemas a titular con el NGP

Para poder asegurar que las propiedades de los sistemas se deben a su identidad y no a que están floculando o cremando, se realizó un monitoreo del tamaño de partícula (D_h diámetro hidrodinámico) por lo menos 7 días. Todos los datos fisicoquímicos que se discuten a lo largo de este capítulo se obtuvieron dentro de los primeros 3 días (a excepción de SEM y TEM) sin embargo, el monitoreo de al menos 7 días nos asegura que el sistema es estable (ya que después del 7° día se observa floculación de los sistemas). El pH de las soluciones estudiadas fue medido antes y después de la titulación con NGP y resultó ~ 7 . La fig. 4.0a muestra la variación del D_h a lo largo de 7 días de todos los sistemas estudiados, y la fig. 4.0b muestra el aspecto físico presentado por los mismos.

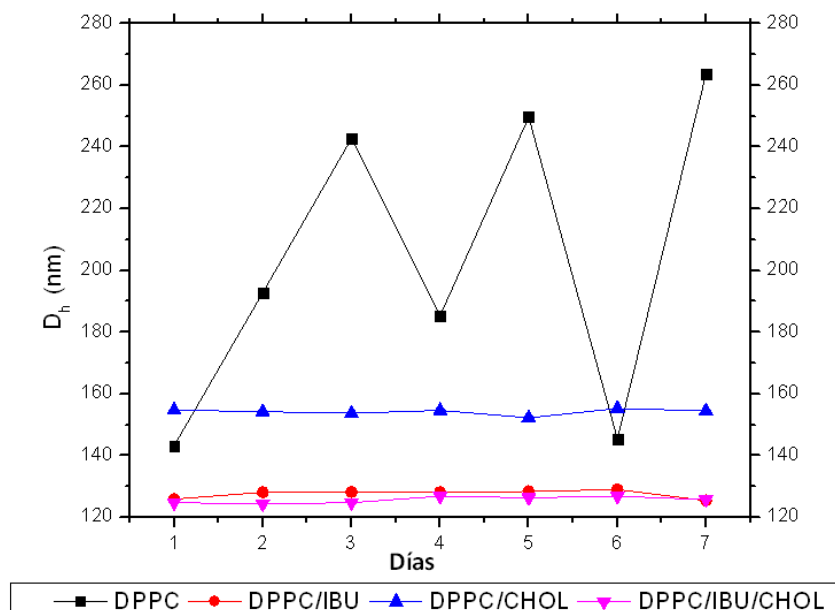


Fig. 4.0a. Variación del D_h de los sistemas DPPC (negro), DPPC: IBU (rojo), DPPC: CHOL (azul) y DPPC: IBU: CHOL (rosa), a lo largo de 7 días, antes de ser titulados con NGP en solución acuosa.

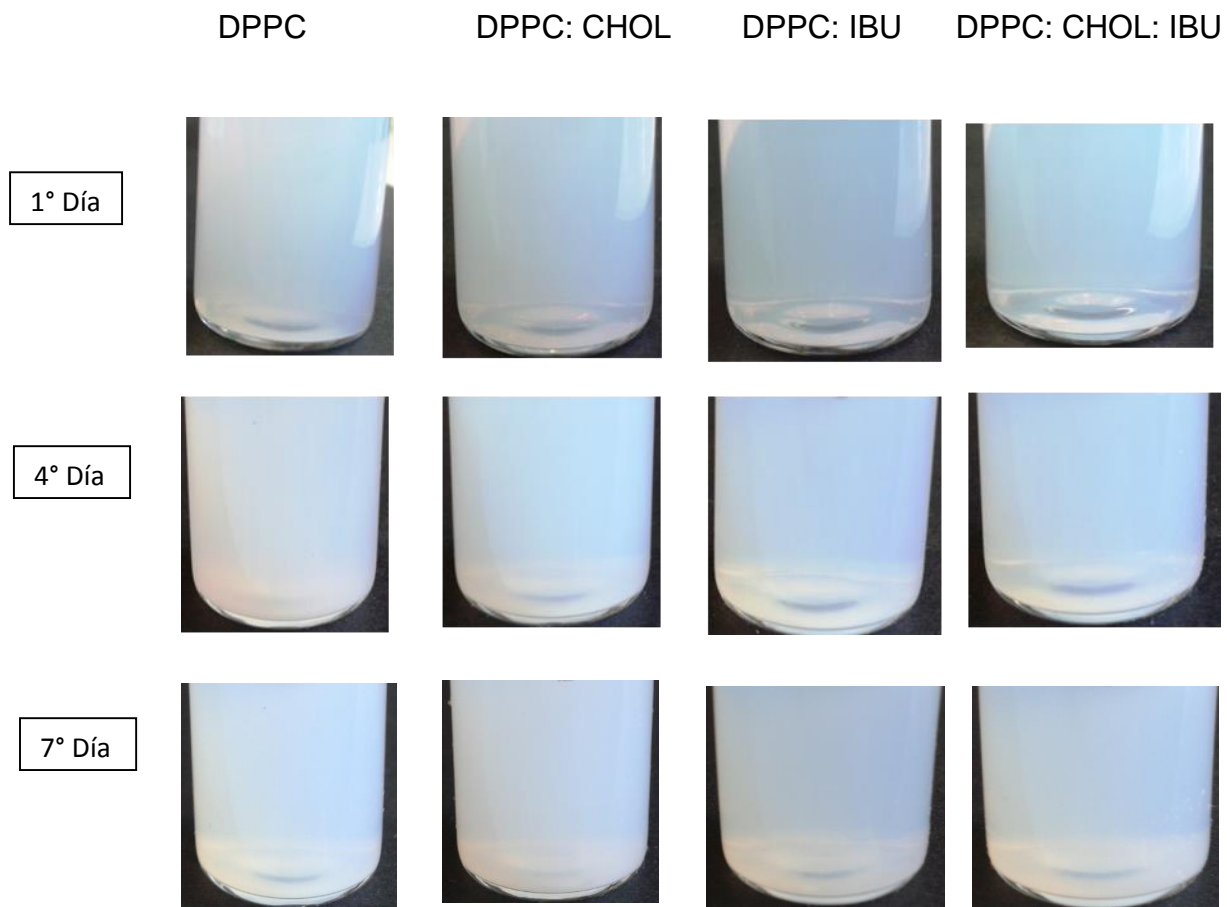


Fig. 4.0b. Aspecto físico de los sistemas DPPC (negro), DPPC: IBU (rojo), DPPC: CHOL (azul) y DPPC: IBU: CHOL (rosa), a lo largo de 7 días, antes de ser titulados con NGP en solución acuosa.

4.1 SISTEMA DPPC (10mM)

4. 1.1 DLS, SEM, TEM y DSC ANTES DE LA TITULACIÓN CON NGP

La figura 4.1a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM) determinada por DLS. El D_h promedio es 165.1 ± 102.4 nm. La figura 4.1b presenta la distribución Nicomp que ofrece el instrumento utilizado para hacer este estudio. Las características únicas de alta resolución de este aparato permiten separar poblaciones bimodales cercanas a través del uso del algoritmo "Nicomp". En este sistema, la distribución Nicomp muestra la presencia de dos poblaciones, una de alrededor de 184.0 nm que representa el 85.03 % de las partículas y otra de 55.6nm que representa el 14.97%. En estas gráficas y las que se mostrarán en todo este capítulo, los datos por intensidad se muestran en color azul.

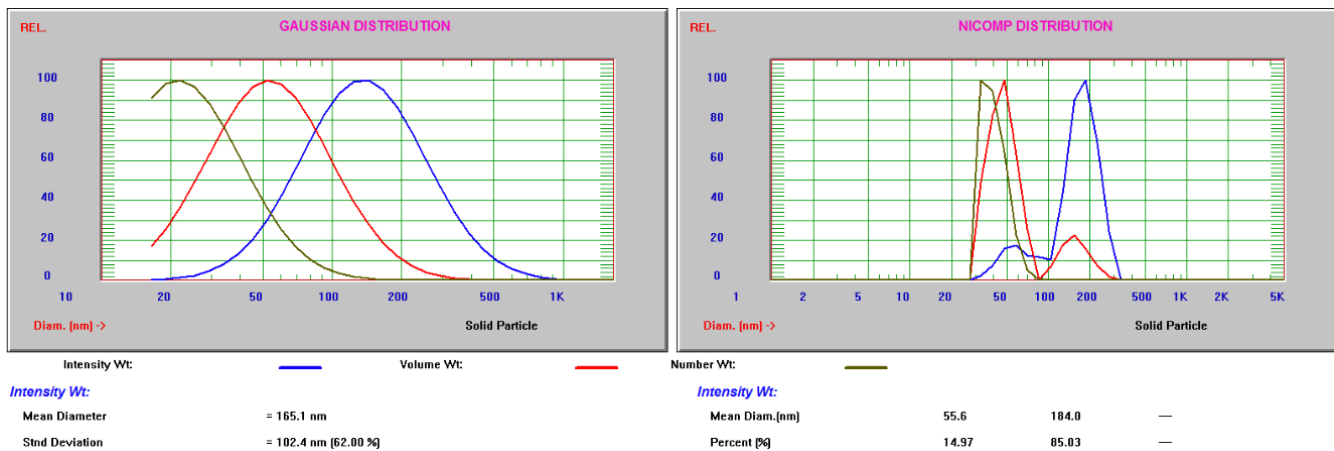


Fig. 4.1a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)

Fig. 4.1b Distribución Nicomp del tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)

La SEM arrojó para estos sistemas la imágenes presentadas en las figura 4.1c (a,b y c) en las que se puede observar la presencia de liposomas esféricos. La TEM arrojó las imágenes presentadas en las figura 4.1c (d, e y f) en las cuales se puede observar que los liposomas formados son unilamelares. Mediante TEM se pueden apreciar estructuras cuyo tamaño concuerda con el encontrado mediante DLS. En el caso de SEM, debido a las características de la técnica y a la manipulación de la muestra, se aprecian en la superficie conglomerados, mientras que en el fondo parece apreciarse haber liposomas más pequeños que corresponderían a los detectados en TEM y DLS.

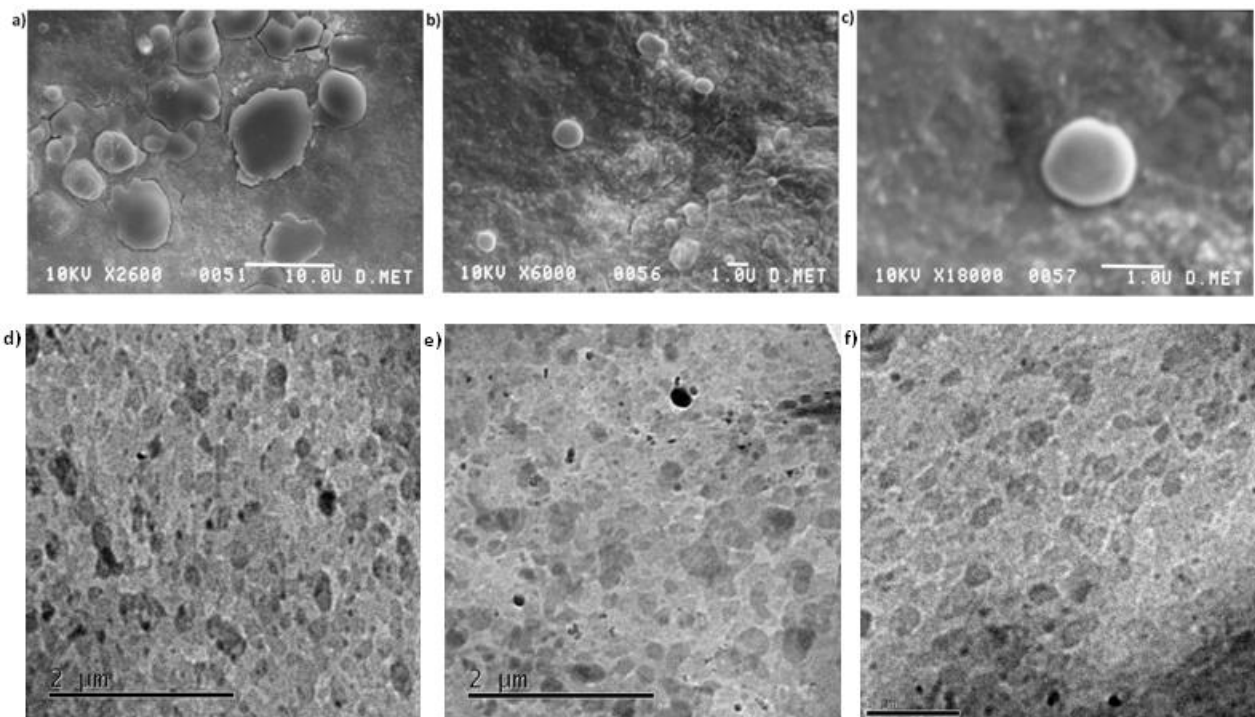


Fig. 4.1c. Microscopía electrónica de barrido, SEM (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM).

Todos los sistemas presentados en este trabajo también fueron estudiados por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados obtenidos se resumen en figura 4.1d

El termograma DSC para el sistema DPPC que estamos analizando, se presenta en la fig. 4.1d, se observa que se logró reproducir los datos reportados en la literatura: $T_p = 34.49\text{ }^\circ\text{C}$, $T_m = 40.85\text{ }^\circ\text{C}$, el $\Delta H = 5.160\text{ kcal mol}^{-1}$ y el $\Delta S = 16.43\text{ cal K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ [Ref 1].

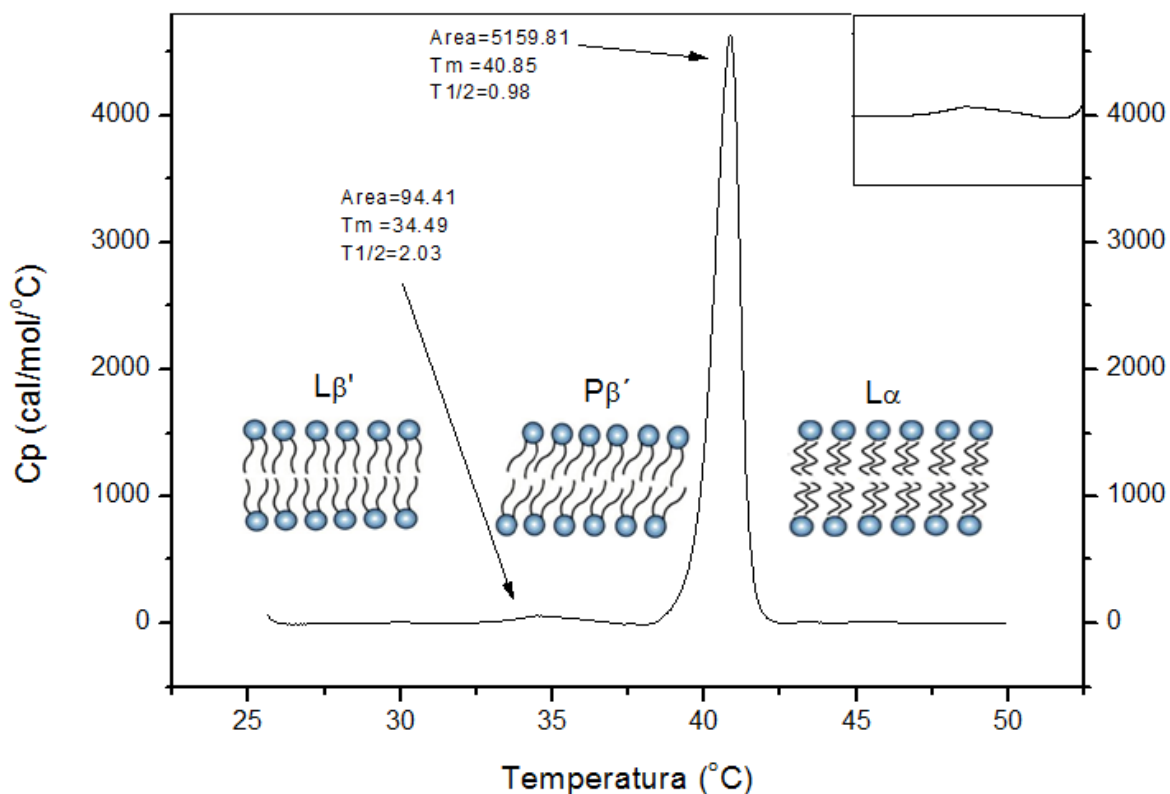


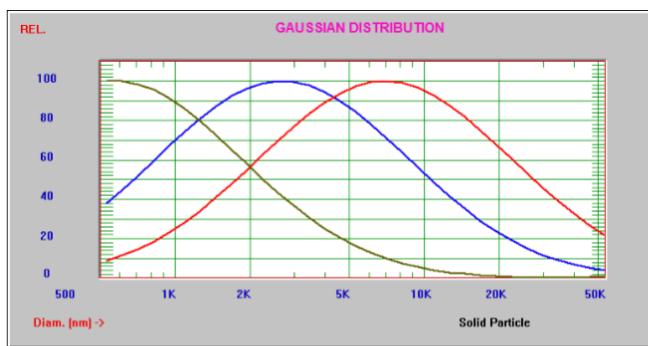
Fig. 4.1d. Termograma DSC para el sistema DPPC (10mM), donde se aprecian las tres fases: fase gel $L\beta'$; fase ondulada $P\beta'$; y la fase líquida-cristalina o fase fluida. Se muestran las transiciones de fase: la pre-transición (T_p) que corresponde a la transición de la fase gel a la fase ondulada; la transición principal (T_m) que corresponde al cambio de la fase ondulada a la fase fluida.

4.2 SISTEMA DPPC (10mM) + NGP (4mM)

4.2.1 DLS, SEM, TEM y DSC

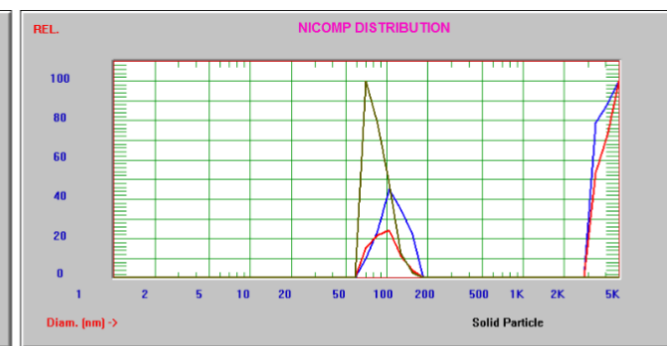
Una solución de DPPC (10mM) fue añadida a una solución acuosa 4mM de NGP en un calorímetro Thermometric 2277 THERMAL ACTIVITY MONITOR (TAM). Se colocaron 2 ml de una solución acuosa 4mM de NGP en la celda y se hicieron 30 adiciones de 25µl de DPPC (10mM) a 298.15K. El calor involucrado en este proceso fue monitoreado y posteriormente analizado con la finalidad de determinar la constante de partición como se detalla más adelante. Al término de las adiciones la solución resultante [DPPC (2.75mM) + NGP (2.9)] fue analizada por DLS, TEM y SEM.

La figura 4.2a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM) + NGP (2.9mM) determinada por DLS. El D_h promedio es 5304.9 ± 6185.5 nm. Se observa que el D_h incrementó drásticamente, sugiriendo que el NGP se introdujo en las estructuras formadas por DPPC descritas anteriormente. La desviación estándar indica que el sistema es poco estable. La figura 4.2b distribución Nicomp por intensidad muestra también dos poblaciones, una alrededor de 3761.4nm que representa el 68.87% de las partículas y otra de 112.2nm que representa el 31.13%. La diferencia entre las diferentes distribuciones confirma la inestabilidad del sistema.



Intensity Wt:
Mean Diameter = 5304.9 nm
Std Deviation = 6185.5 nm (116.60 %)

Fig. 4.2a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM) + NGP (2.9mM)]



Intensity Wt:
Mean Diam.[nm] 112.2 3761.4 —
Percent [%] 31.13 68.87 —

Fig. 4.2b. Distribución Nicomp de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM) + NGP (2.9mM)]

La SEM arrojó para estos sistemas la imágenes presentadas en las figuras 4.2c (a, b y c) en las que se puede observar la presencia de estructuras esféricas e irregulares que concuerdan con los datos obtenidos por DLS. La TEM arrojó las imágenes presentadas en las figuras 4.4 (d, e y f) en las cuales se puede observar conglomerados de liposomas y también liposomas aislados de menor tamaño que corresponden probablemente a las estructuras detectadas en DLS mediante la distribución Nicomp. Los resultados obtenidos sugieren que el NGP se inserta en los liposomas formados por DPPC dando origen a conglomerados pero también subsisten estructuras esféricas.

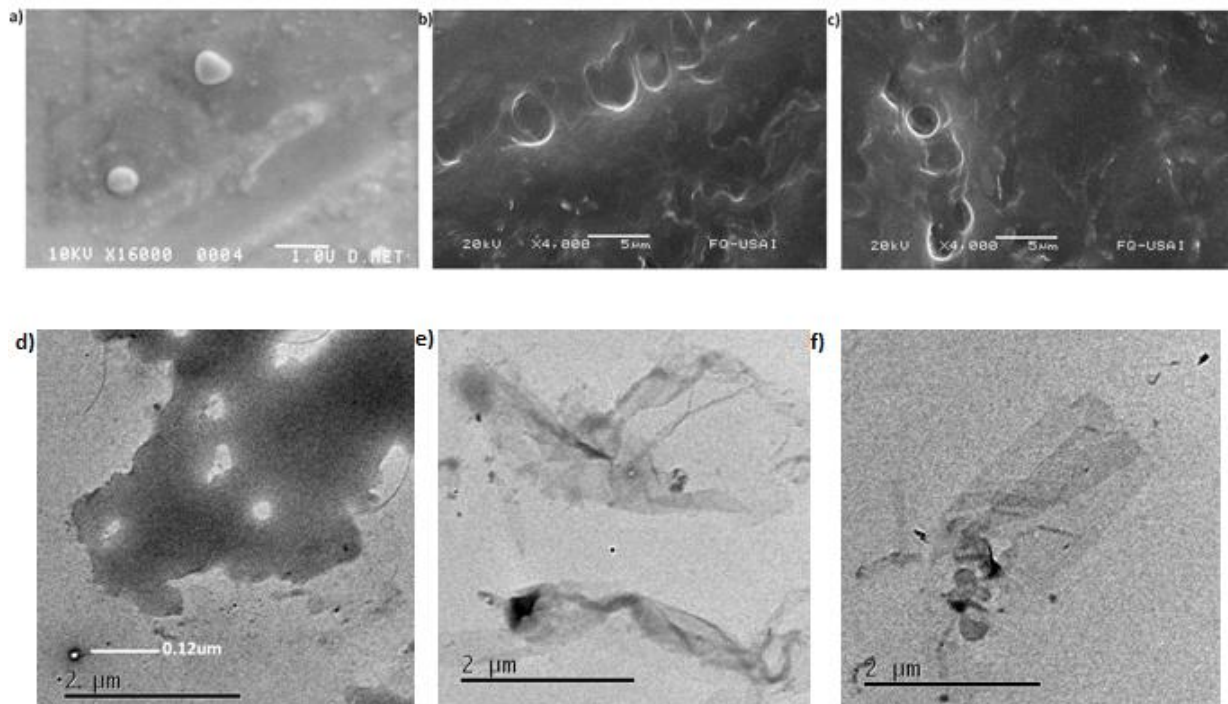


Fig 4.2c. Microscopía electrónica de Barrido, SEM (a, b y c) y la microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM) /CHOL (4:1) con NGP insertado. Se observan diversas estructuras en forma de esfera y conglomerados.

En la figura 4.2d, se presenta el termograma obtenido por DSC que compara el sistema DPPC/NGP con el DPPC puro.

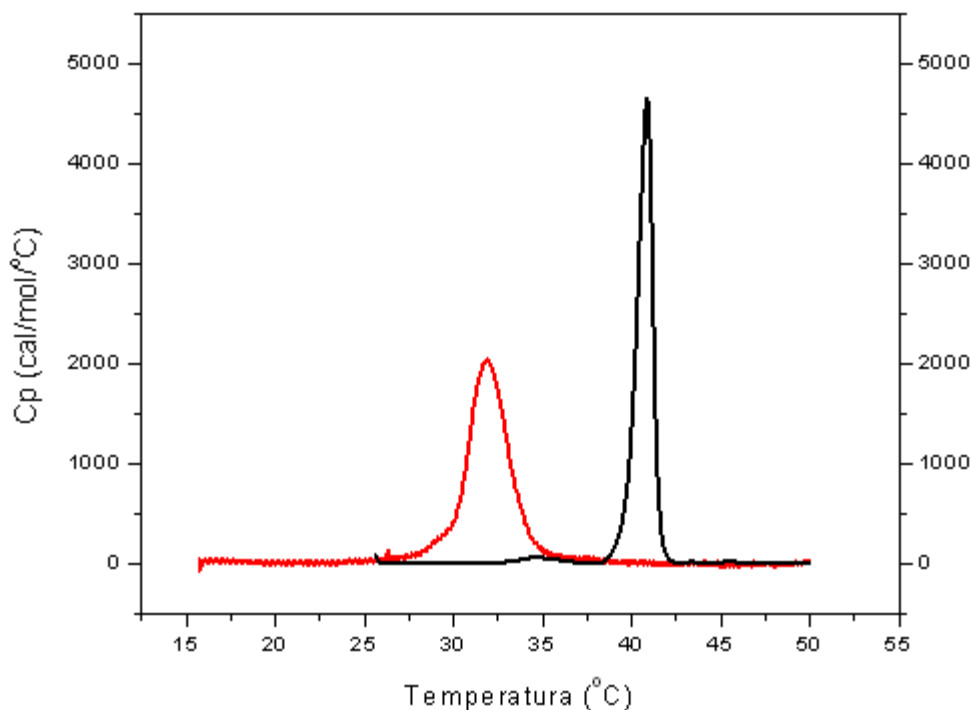


Fig. 4.2d. Termograma de liposomas puros de DPPC y DPPC/NGP. En negro se muestran los liposomas puros de DPPC y en rojo en presencia de NGP.

Como se puede apreciar, la partición del NGP en los liposomas puros perturba su estructura, de tal manera que suprime la pre-transición (T_p), debido a que el NGP causa una interrupción del orden estructural de las cadenas alifáticas, es decir, un cambio en el empaquetamiento de las cadenas alifáticas fig. 4.2e. La fig. 4.9b, muestra los cambios ocurridos al añadir NGP al sistema DPPC. La entalpía (ΔH) incrementa de $5.160 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $6.107 \text{ kcal mol}^{-1}$, dado que ΔH es el área bajo la curva y para el sistema DPPC/NGP ésta es más ancha. En cuanto a la cooperatividad (caracterizada por el inverso de $T_{1/2}$) donde $T_{1/2}$ incrementa de 0.98 a 2.42 °C , se puede decir que la transición principal es menos cooperativa (mayor $T_{1/2}$), esto indica que se requiere mayor energía para que se lleve a cabo la transición de la fase gel a la líquido-cristalino, esto viene acompañado también de un incremento en el ΔS que pasa de 126.31 a $191.49 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, aumenta el

número de micro-estados del sistema, aumenta el desorden. En cuanto a la transición principal (T_m), se observa un abatimiento de $40.85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $34.49\text{ }^{\circ}\text{C}$, esto se debe a la pérdida de orden en la membrana y a la pérdida de la inclinación de los fosfolípidos que acompaña a esta transición, por lo que se presenta una pérdida de la estabilidad térmica (menor T_m).

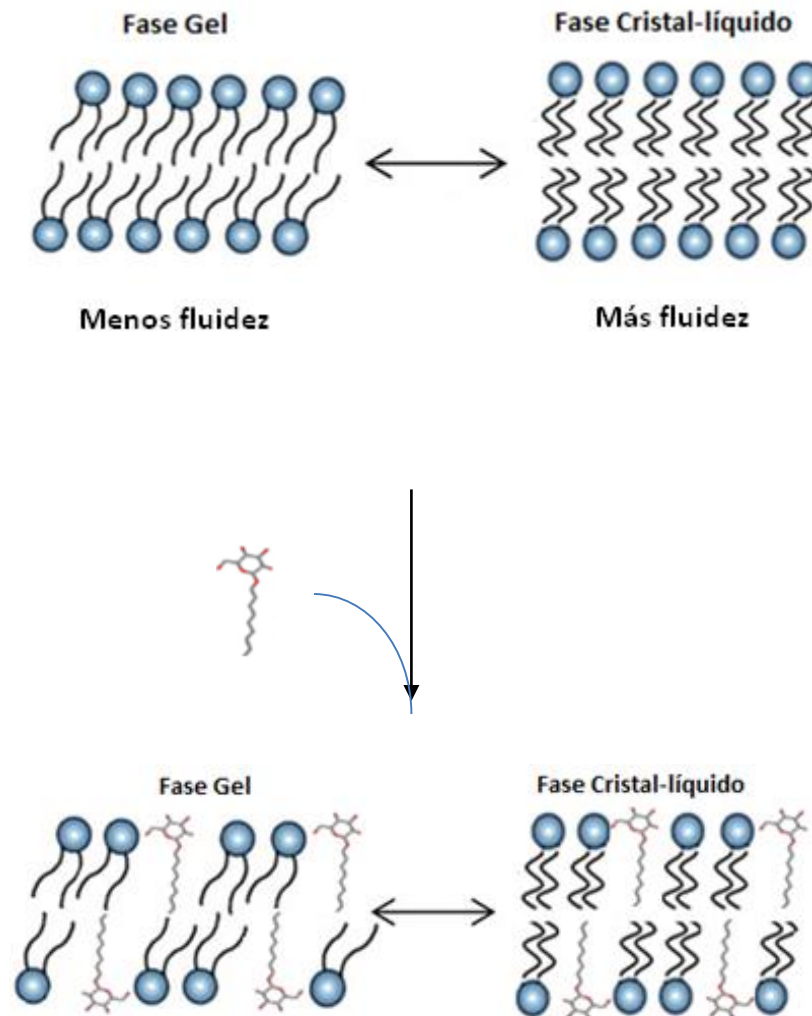


Fig. 4.2e. Se muestra cómo la partición del NGP en la membrana de DPPC hace que se pierda el orden, empaquetamiento e inclinación de los fosfolípidos.

Estos parámetros sugieren que el NGP es capaz de penetrar en la membrana, una medida cuantitativa de este fenómeno es la K de partición determinada por ITC, cuya gráfica se muestra en la figura 4.2e y que resultó ser 14.19 mM^{-1}

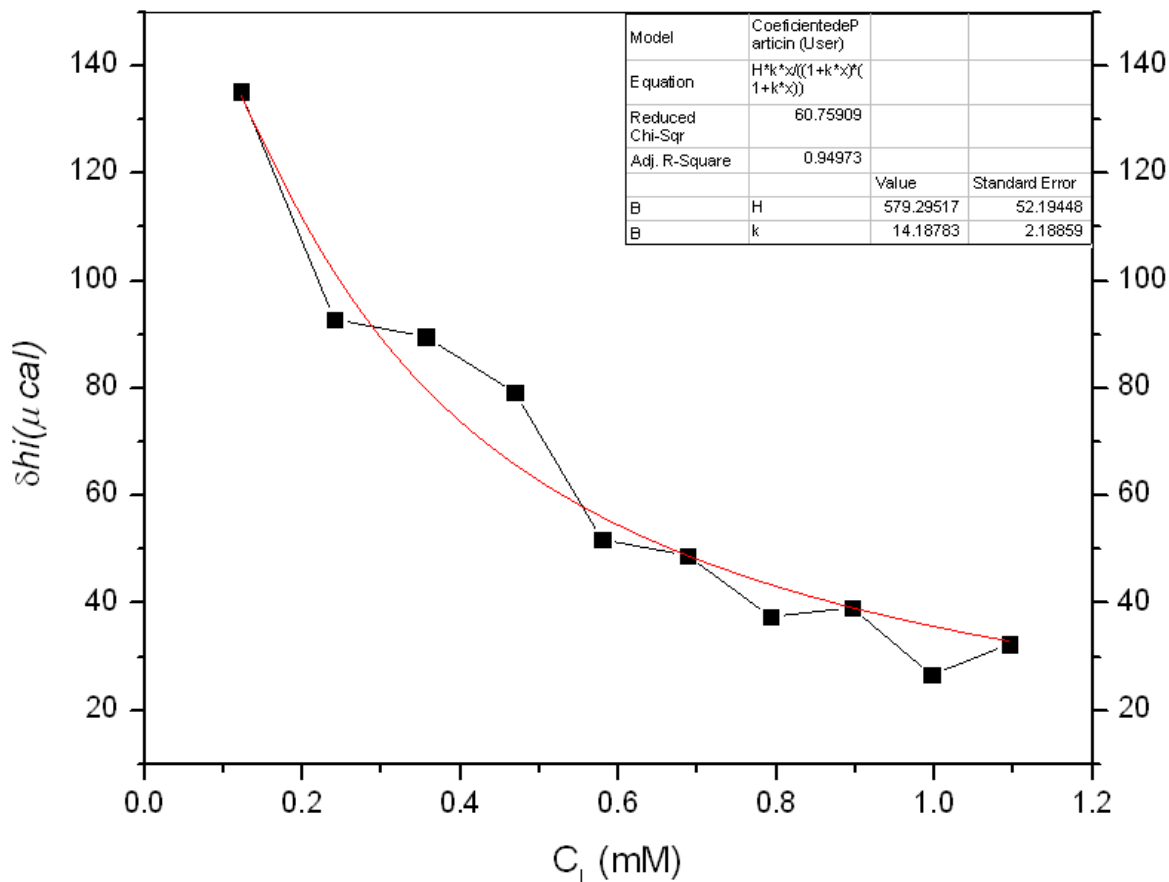
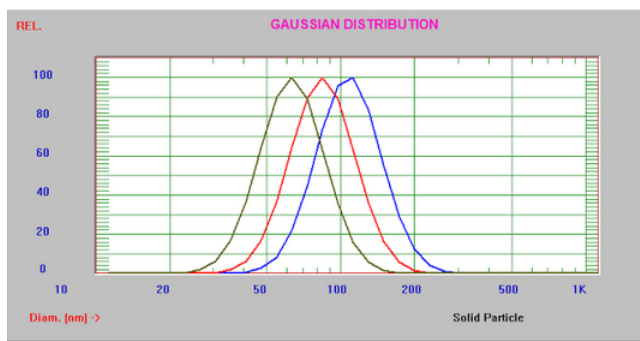


Fig. 4.2f. Entalpograma del nonil- β -D-glucopiranosido con vesículas extrudidas de DPPC 10mM a pH 7.2. Cada cuadro negro corresponde a la inyección de 25 μ l de suspensión de lípido dentro de la celda de reacción ($V_{\text{celda}} = 2 \text{ ml}$ de NGP 4mM), y los círculos rojos denotan la predicción teórica, calculados con el modelo de partición a partir de la ecuación 27 de la sección de **análisis termodinámico**: concentración de NGP $C_D = 4 \text{ mM}$, $K = 14.19 \text{ mM}^{-1}$, $\Delta H^0 = 72.41 \text{ } \mu\text{cal/mmol}$. De donde la K y ΔH^0 fueron obtenidos considerando toda la curva de titulación experimental. Todos los calores denotan reacciones endotérmicas (calores positivos).

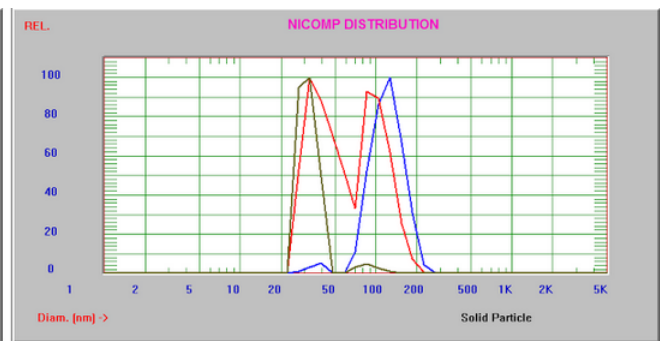
4.3 SISTEMA DPPC (10mM)/CHOL (4:1)

4.3.1 DLS, SEM y TEM

La figura 4.3a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/CHOL (4:1) determinada por DLS. El D_h promedio es 112.2 ± 33.9 nm. La figura 4.3b presenta la distribución Nicomp. En este sistema, la distribución Nicomp muestra la presencia de dos poblaciones, una de alrededor de 125 nm que representa el 95.3 % de las partículas y otra de 35.9 nm que representa el 4.85%.



Intensity Wt:		Volume Wt:	
Mean Diameter	= 112.2 nm		
Std Deviation	= 33.9 nm (30.20 %)		



Number Wt:			
Intensity Wt:			
Mean Diam.(nm)	35.9	125.3	—
Percent (%)	4.85	95.15	—

Fig. 4.3a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/CHOL (4:1).

Fig. 4.3b Distribución Nicomp del tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/CHOL (4:1).

La SEM arrojó para estos sistemas las imágenes presentadas en las figura 4.3c (a, b y c) en las que se pueden observar estructuras de aproximadamente 2 μm de diámetro que se podrían atribuir a liposomas que se han fusionado. Parece apreciarse en el fondo liposomas esféricos grandes. La TEM arrojó las imágenes presentadas en las figura 4.3c (d, e y f) en las cuales se puede observar que los liposomas formados son unilamelares y corroboran los resultados obtenidos por DLS.

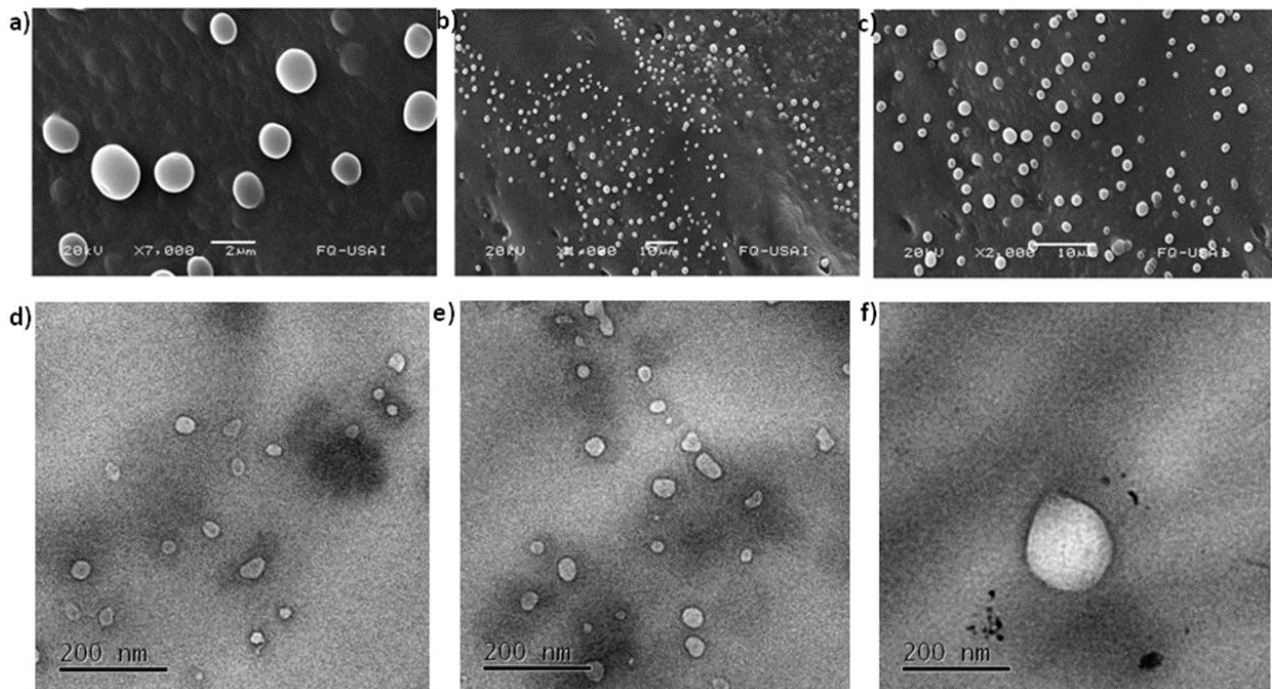


Fig. 4.3c. Microscopía electrónica de barrido, SEM (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM) /CHOL (4:1).

En la figura 4.3d, se presenta el termograma obtenido por DSC para el sistema DPPC: CHO

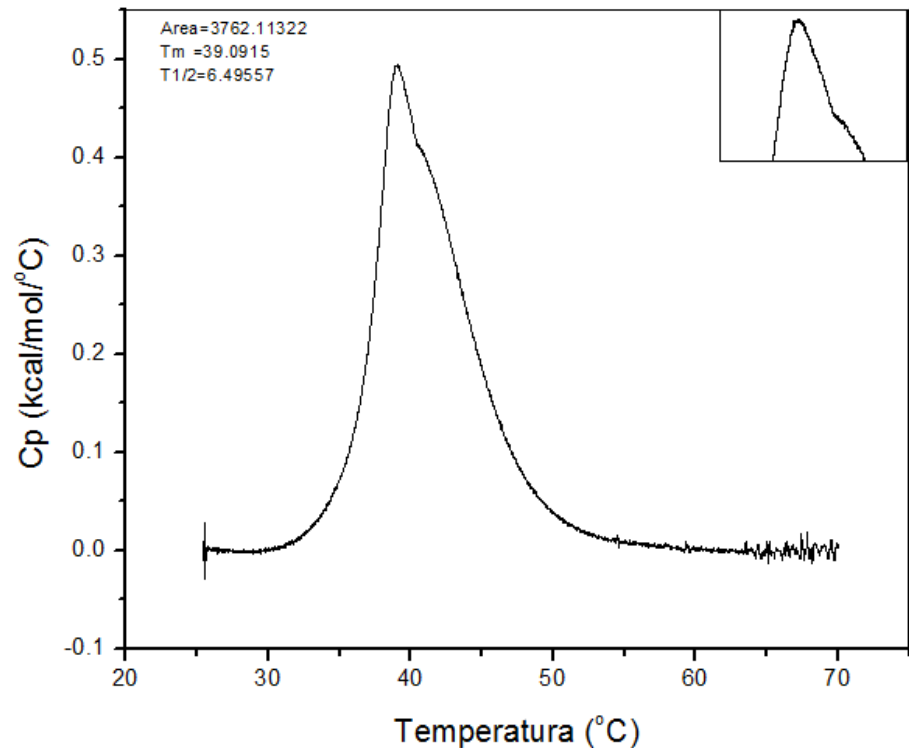


Fig. 4.3d. Termograma DSC para el sistema DPPC (10mM)/CHOL (4:1). Sus parámetros termodinámicos son: $T_m = 39.0\text{ }^\circ\text{C}$, el $\Delta H = 3.762\text{ kcal mol}^{-1}$ y el $\Delta S = 12.05\text{ cal K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$.

Se sabe que el CHOL amplía la transición de fase de gel a cristal-líquido, incrementa ligeramente la T_m (no siempre) y reduce el ΔH . Esto se debe a que el colesterol induce un estado intermediario "Lo" (fase líquida ordenada) en las moléculas de fosfolípido con las cuales éste interactúa, incrementando la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas por debajo de la T_m , y decreciendo la fluidez por arriba de T_m (fig. 4.3e). Esto se debe a que los fosfolípidos están ordenados y mayormente extendidos al asociarse con CHOL (fig. 4.3f), por lo que las moléculas tienen una alta movilidad rotacional y lateral [Ref. 2]

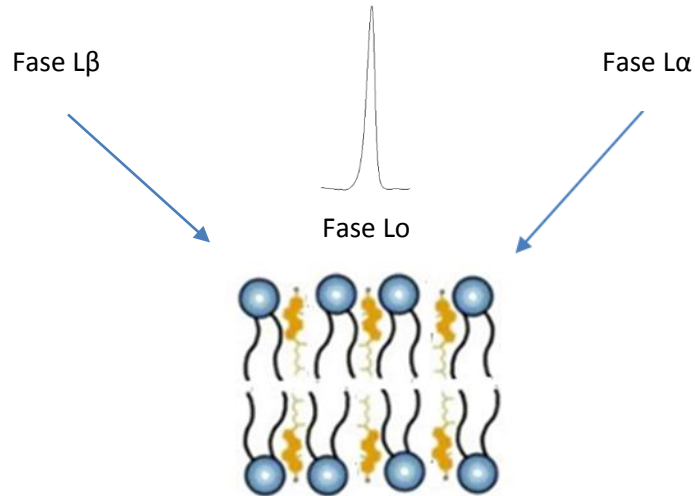


Fig. 4.3e. Se muestra el estado intermedio "Lo" (fase líquida ordenada) que forma el CHOL en la transición de fase.

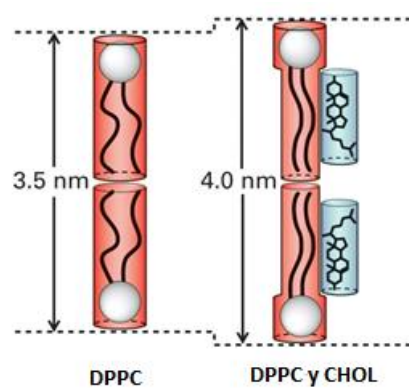


Fig. 4.3e. Se muestra esquemáticamente cómo el CHOL induce la extensión de la cadena de acilo de los fosfolípidos, lo que permite que tengan mayor movilidad rotacional.

Como se dijo el CHOL incrementa la rigidez de la membrana, es decir disminuye la fluidez de $L\alpha$ (fase fluida), esto se puede deber a que el hidroxilo se orienta hacia la fase acuosa para no causar impedimento estérico y su anillo tricíclico se intercala entre los primeros carbonos de las cadenas de ácidos grasos; ya que los anillos esteroidales del CHOL son densos, el añadir CHOL a la bicapa lipídica, provoca que

aumente la densidad en la sección hidrofóbica, esto disminuye la flexibilidad de las cadenas lipídicas vecinas, incrementa la rigidez mecánica de las bicapas de fluido y disminuye su difusión lateral (flip-flop) (fig. 4.3f). Además el CHOL inhibe la cristalización de las cadenas alquílicas para pasar de la fase gel a la líquida-cristalina [Ref. 3] (menor T_m). Nótese que se presenta un hombro lateral en la fase L_α , esto se debe a la formación de dominios de CHOL en dicha fase (Colesterol libre-fase $L_\beta \leftrightarrow$ Dominios de colesterol-fase L_α).

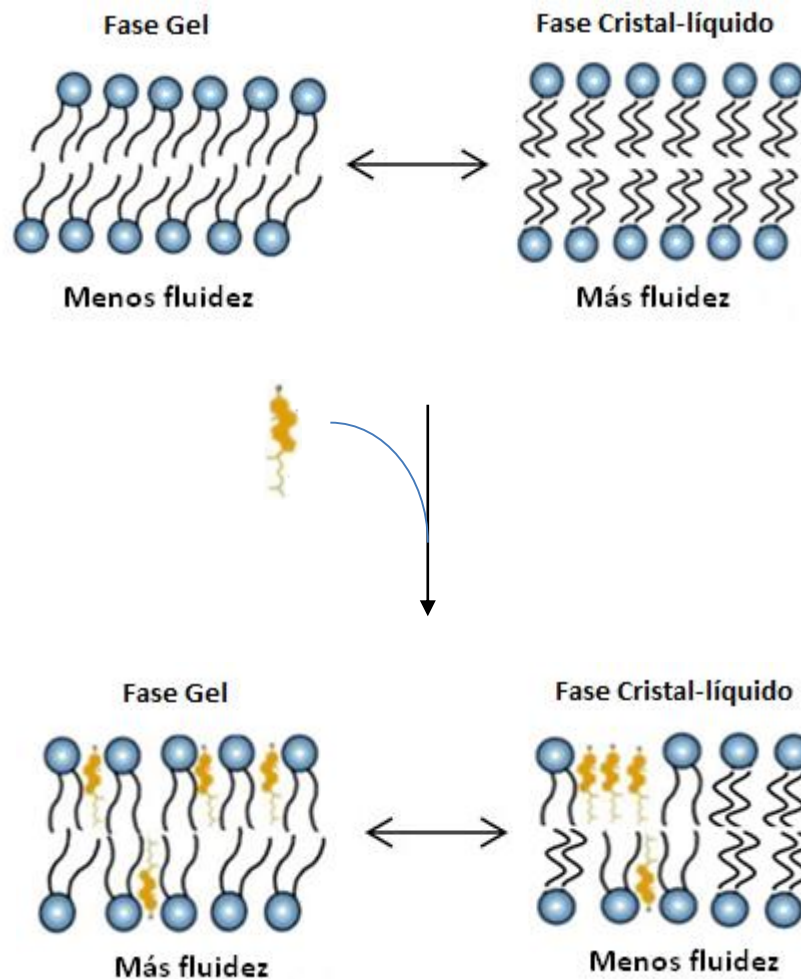


Fig. 4.3f. La presencia de CHOL en la bicapa, hace que ésta sea más empaquetada comparada con los fosfolípidos puros por encima del T_m y más fluido por debajo de la T_m , así que al pasar del estado gel al líquido-cristalino, sólo las colas de los fosfolípidos que no están interactuando con el CHOL son los que presentan la transición de fase. También se aprecian los dominios de CHOL en la fase L_α (hombro lateral).

4.4 SISTEMA DPPC (10mM)/CHOL (4:1) + NGP (4mM)]

4.4.1 DLS, SEM y TEM

Una solución de DPPC (10mM)/CHOL (4:1) fue añadida a una solución acuosa 4mM de NGP en un calorímetro TAM. Se colocaron 2ml de una solución acuosa 4mM de NGP en la celda y se hicieron 30 adiciones de 25µl de DPPC (10mM)/CHOL (4:1) a 298.15K. El calor involucrado en este proceso fue monitoreado y posteriormente analizado con la finalidad de determinar la constante de partición, K, como se detalla más adelante. Al término de las adiciones la solución resultante [DPPC (2.75mM)/CHOL (4:1) + NGP (2.9mM)] fue analizada por DLS, TEM y SEM

La figura 4.4a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/CHOL (4:1) + NGP (2.9mM) determinada por DLS. El D_h promedio es 2078.1 ± 284.7 nm, prácticamente 10 veces mayor que el D_h obtenido para el DPPC/CHOL, sugiriendo que el NGP se introdujo en las estructuras formadas por DPPC: CHOL descritas anteriormente. La presencia de colesterol nuevamente estabiliza las estructuras formadas y esto se ve reflejado en un valor menor de la desviación estándar comparada con aquella obtenida para el sistema DPPC + NGP sin colesterol. La figura 4.4b muestra la distribución Nicomp por intensidad, solamente se observa una población de 2012.3nm (100%) mientras que en la distribución Nicomp por número también se alcanza a apreciar otra población muy pequeña de cerca de 200nm, debido a que, como ya se ha dicho, Nicomp presenta mejor resolución.

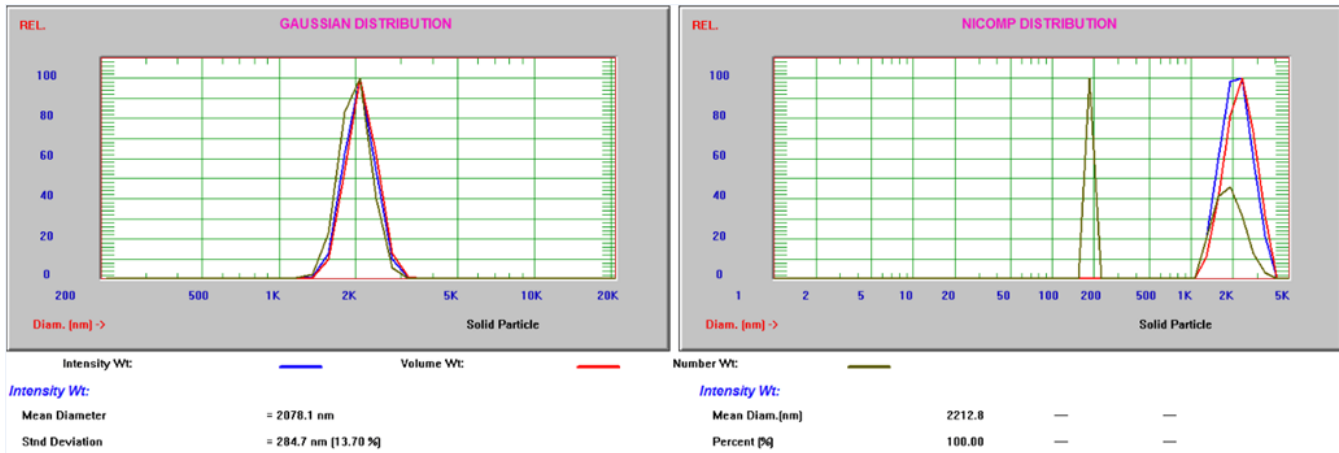


Fig. 4.4a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/CHOL (4:1) + NGP (2.9mM)

Fig. 4.4b. Distribución Nicomp de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/CHOL (4:1) + NGP (2.9mM)

La SEM arrojó para estos sistemas la imágenes presentadas en las figuras 4.4c (a,b y c) en las que se puede observar la presencia de estructuras esféricas y en forma de cubo. La TEM arrojó las imágenes presentadas en las figura 4.4c (d, e y f) en las cuales se puede observar la formación de estructuras en forma de conglomerados de liposomas y también permanecen liposomas aislados de menor tamaño que corresponden probablemente a las estructuras detectadas en DLS mediante la distribución Nicomp. Los resultados obtenidos sugieren que el NGP se inserta en los liposomas formados por DPPC/CHOL dando origen a conglomerados pero también subsisten estructuras esféricas.

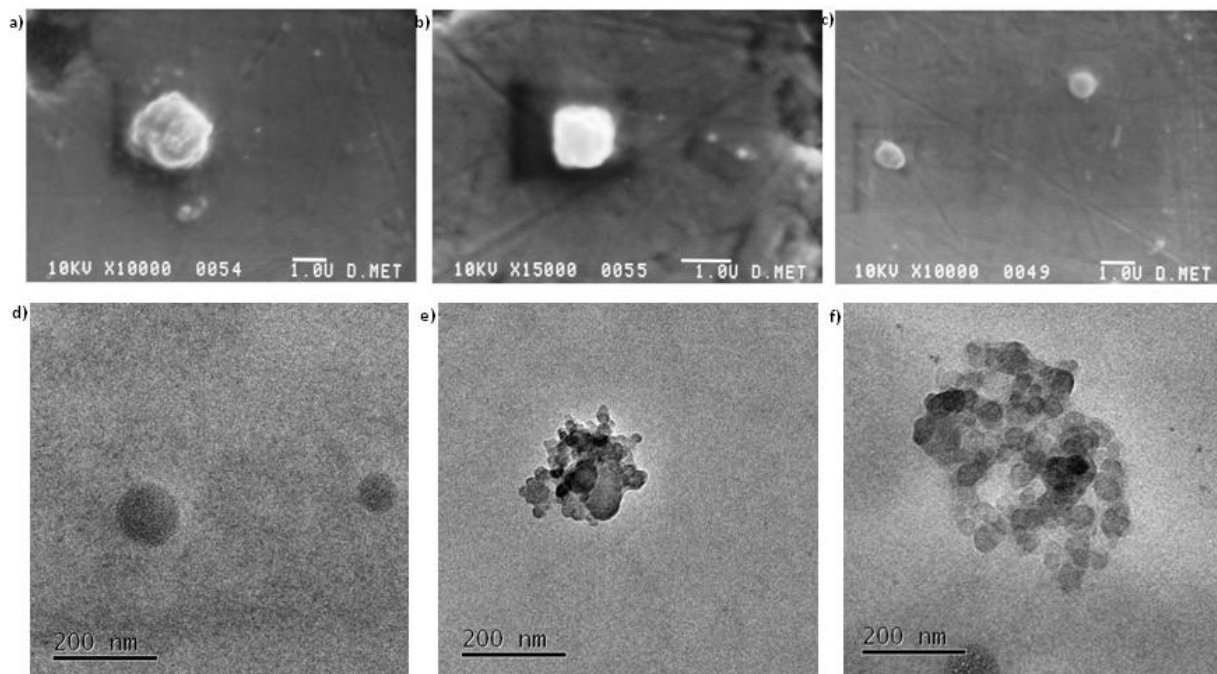
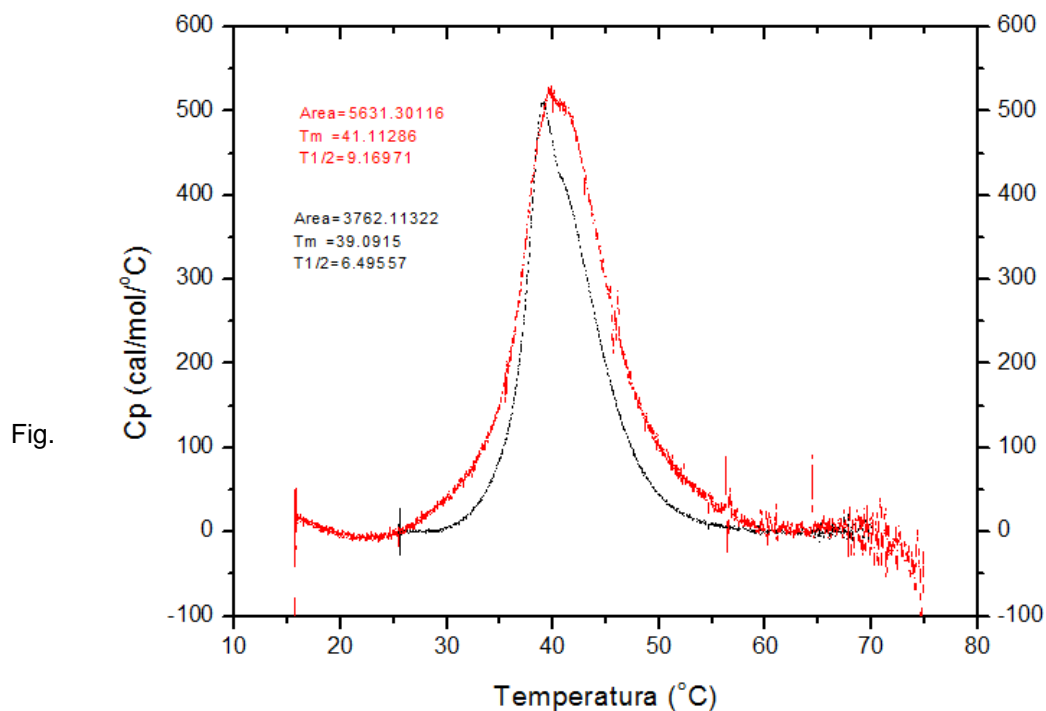


Fig. 4.4c. Microscopía electrónica de Barrido, SEM (a, b y c) y la microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM) /CHOL (4:1) con NGP insertado. Se observan diversas estructuras en forma de esfera y conglomerados.



4.4d. Termograma de liposomas puros de DPPC: CHOL y DPPC: CHOL/NGP. En negro se muestran los liposomas puros de DPPC: CHOL y en rojo en presencia de NGP.

La fig. 4.4d muestra el termograma de liposomas puros de DPPC: CHOL y DPPC: CHOL/NGP. En negro se muestran los liposomas puros de DPPC: CHOL y en rojo en presencia de NGP. Se puede apreciar la presencia de dominios en la membrana del sistema DPPC: CHOL al presentar un hombro lateral, y éste se hace más evidente al agregar NGP (sistema DPPC: CHOL/NGP) en donde seguramente el NGP tiene mayor afinidad en interactuar con los dominios de CHOL en la bicapa lipídica (ver fg.4.4e). La fig.4.9b, muestra los cambios ocurridos al añadir NGP al sistema DPPC: CHOL.

La entalpía (ΔH) incrementa de $3.762 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $5.0631 \text{ kcal mol}^{-1}$, dado que ΔH es el área bajo la curva y para el sistema DPPC: CHOL/NGP ésta es más ancha. También la cooperatividad, caracterizada por $T_{1/2}$, incrementa de 6.49 a $9.16 \text{ }^\circ\text{C}$, es decir, la transición principal es menos cooperativa (mayor $T_{1/2}$), esto indica que se requiere mayor energía para que se lleve a cabo la transición de la fase gel a la líquido-cristalina, esto viene acompañado también de un incremento en el ΔS que pasa de 12.04 a $17.92 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, aumenta el número de microestados del sistema, aumenta el desorden.

En cuanto a la transición principal (T_m), se observa un incremento de 39.09°C a 41.11°C , esto se debe a la ganancia de orden en la membrana, por lo que se presenta una ganancia de la estabilidad térmica (mayor T_m).

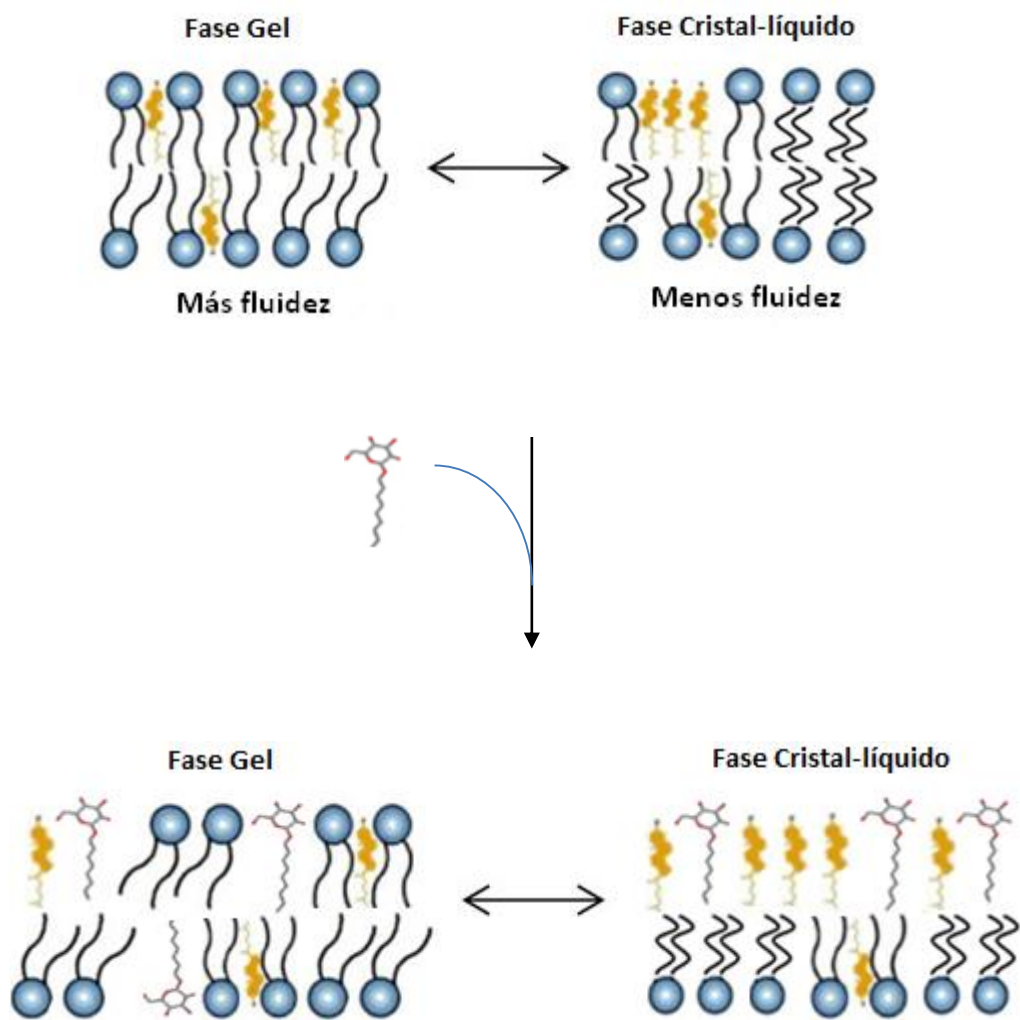


Fig. 4.4e. En la fase gel, el NGP está asociado a través de su cadena única de acilo a los fosfolípidos como si éste fuera uno de ellos, en cambio el CHOL se asocia fuertemente con los fosfolípidos modificando su inclinación y su empaquetamiento. Al pasar a la fase cristal-líquido se observa la presencia de dominios en la membrana del sistema DPPC: CHOL al presentar un hombro lateral, y éste se hace más evidente al agregar NGP (sistema DPPC: CHOL/NGP) en donde el NGP tiene afinidad en interactuar con los dominios de CHOL en la bicapa lipídica.

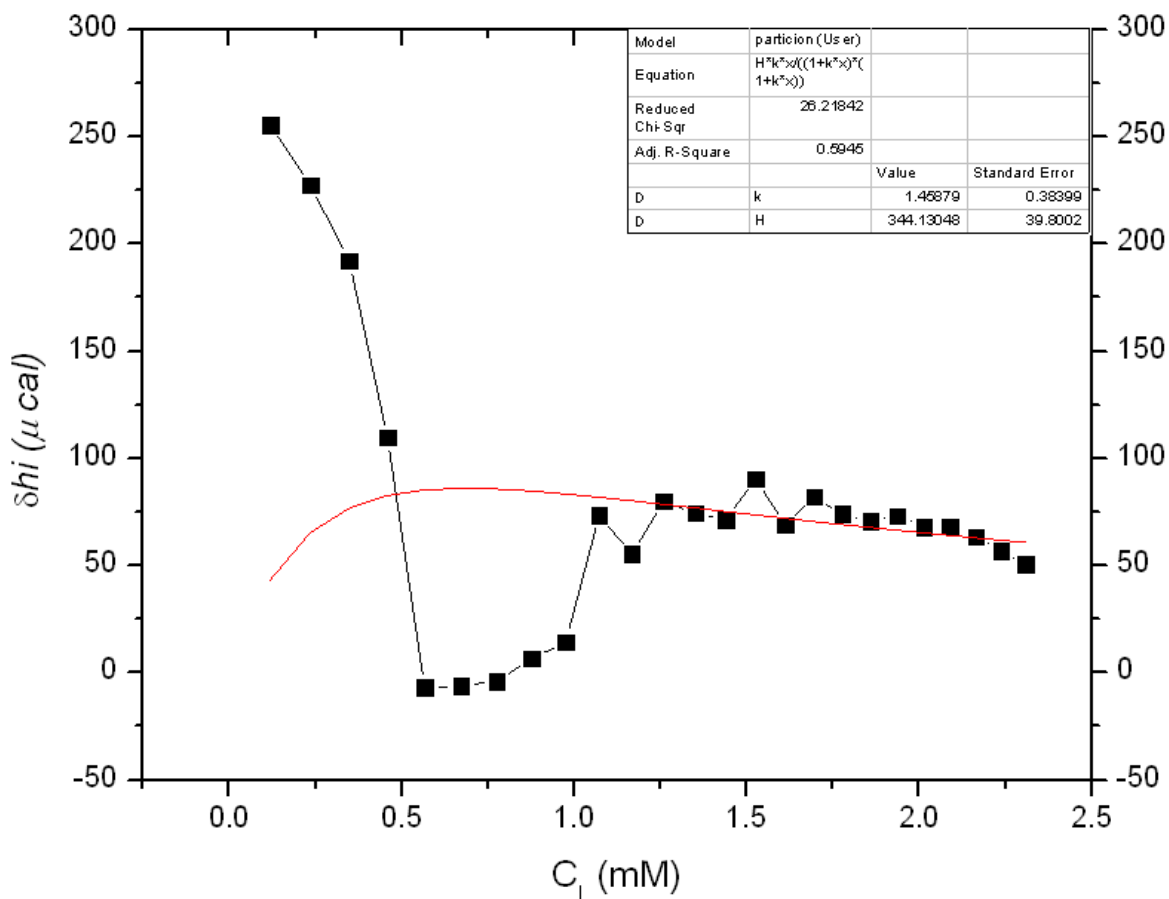


Fig. 4.4f. Titulación calorimétrica del nonil- β -D-glucopiranosido con vesículas extrudidas de DPPC (10mM)/CHOL (4:1) a pH 7.2. Cada cuadro negro corresponde a la inyección de 25 μ l de suspensión de lípido dentro de la celda de reacción ($V_{\text{celda}} = 2$ ml de NGP 4mM), y los círculos rojos denotan la predicción teórica, calculados con el modelo de partición; concentración de NGP $C_D = 4$ mM, $k = 1.46 \text{ mM}^{-1}$, $\Delta H^0 = 43.02 \text{ } \mu\text{cal/mmol}$. K y ΔH^0 fueron ajustados para proveer una curva óptima de la parte suave de la curva de titulación, definida en la parte final de la titulación experimental. No todos los calores denotan reacciones endotérmicas dado que en el estado II, de acuerdo a Lichtenber, se están micelizando los liposomas y formando vesículas mixtas, pero al llegar al estado I (parte suave de la gráfica), los liposomas coexisten con las vesículas mixtas formadas.

Estos parámetros sugieren que el NGP es capaz de penetrar en la membrana, una medida cuantitativa de este fenómeno es la K de partición determinada por ITC, cuya determinación gráfica se muestra en la figura 4.4f y que resultó ser 1.46 mM^{-1}

4.5 SISTEMA DPPC (10mM)/IBU (8:1)

4.5.1 DLS, SEM y TEM

La figura 4.5a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)+ IBU determinada por DLS. El D_h promedio es 102.7 ± 31.4 nm. La figura 4.5b presenta la distribución Nicomp 380. En este sistema, la distribución Nicomp muestra la presencia de una población de alrededor de 108.4 nm 100 % de las partículas.

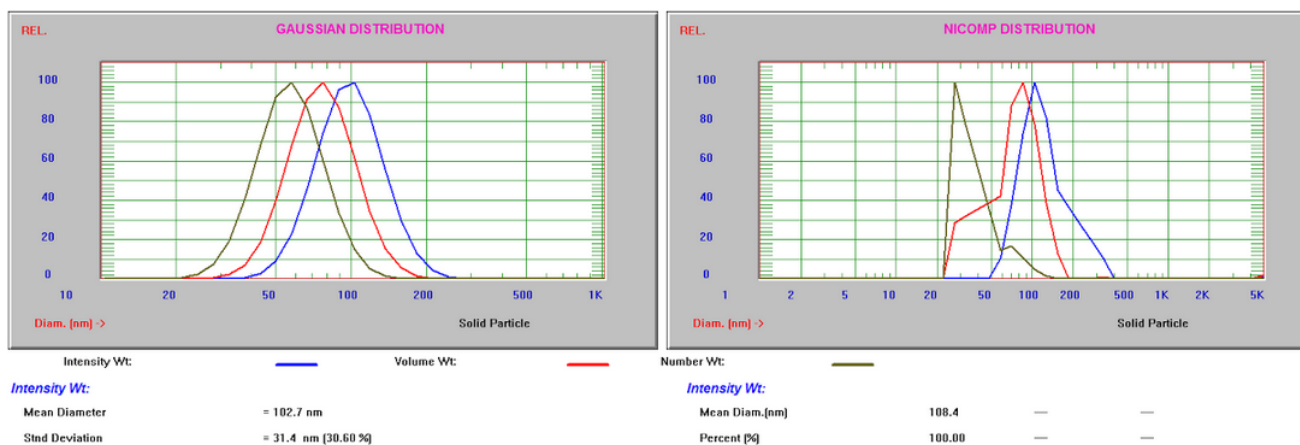


Fig. 4.5a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/IBU (8:1)

Fig. 4.5b Distribución Nicomp del tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/IBU (8:1)

La SEM arrojó para estos sistemas las imágenes presentadas en las figura 4.5c (a, b y c) en las que se puede observar la presencia de liposomas semi-curvedos. La TEM arrojó las imágenes presentadas en la figura 4.5c (d) en la cual se puede observar que los liposomas formados son unilamelares (círculos negros) En todos los casos los resultados de microscopía corroboran aquéllos obtenidos por DLS.

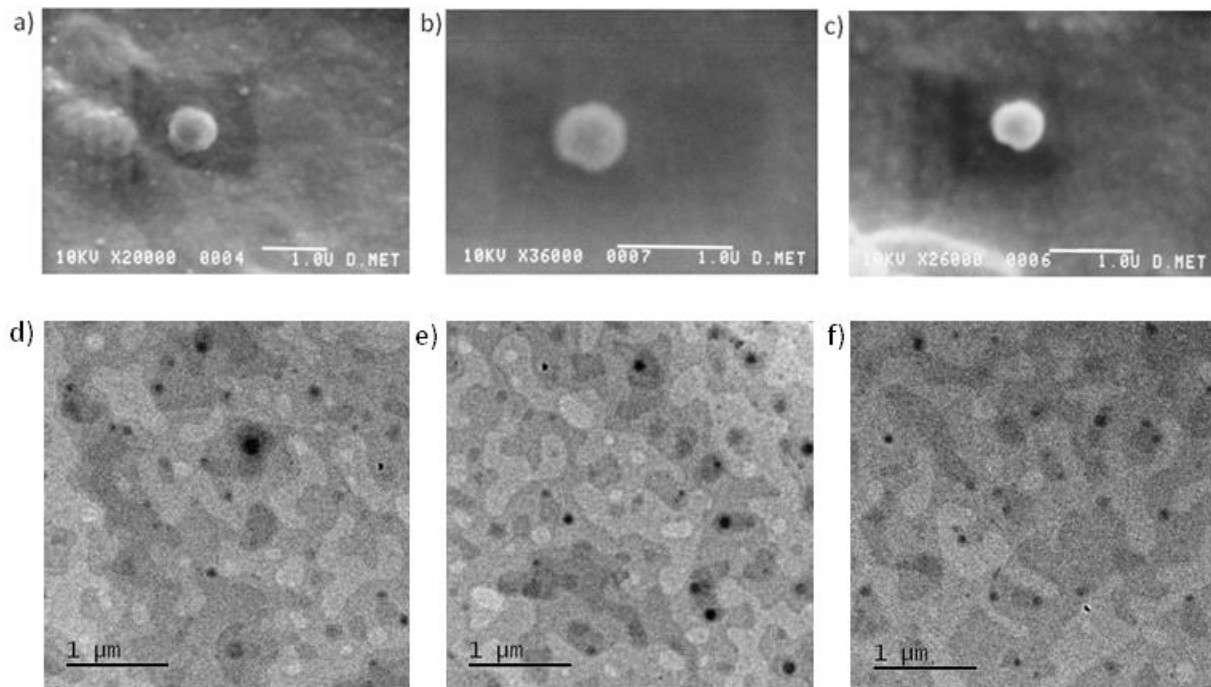


Fig. 4.5c. Microscopía electrónica de barrido, SEM (a, b y c) y microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM). En la fig. 4.5d, se presenta el termograma obtenido por DSC para el sistema DPPC: IBU

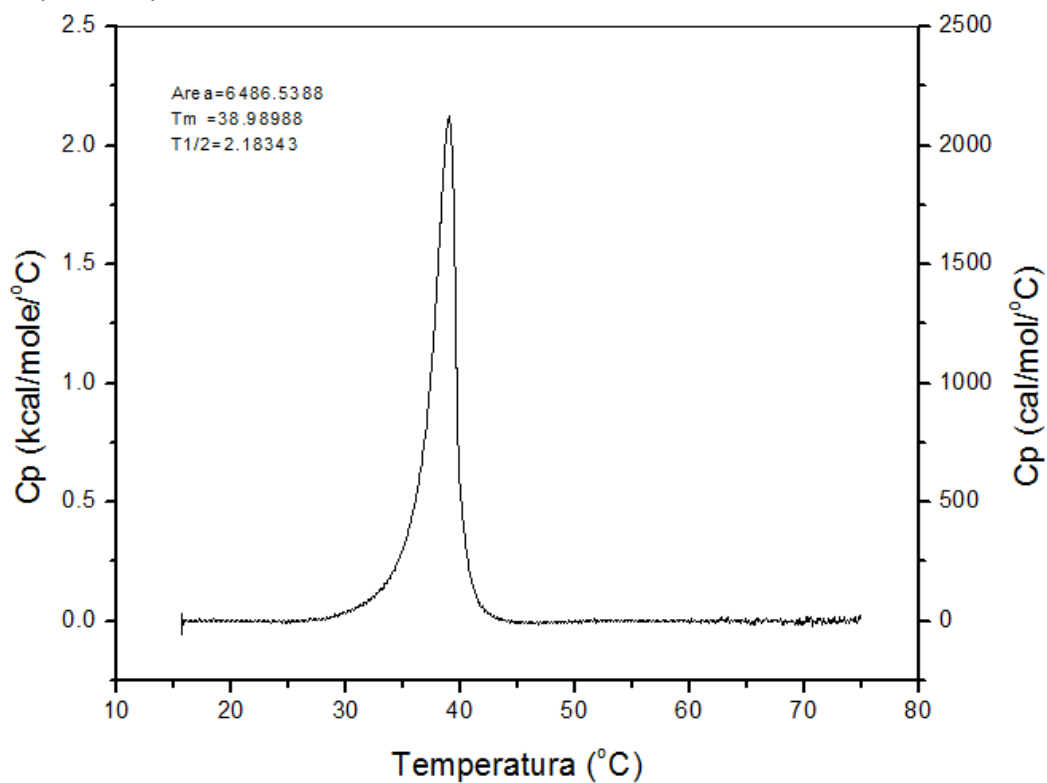


Fig. 4.5d. DSC del sistema DPPC: UBU. Sus parámetros termodinámicos son: $T_m = 38.98$ °C, el $\Delta H = 6.49$ kcal mol⁻¹, el $T_{1/2} = 2.18$ y el $\Delta S = 20.78$ cal K⁻¹mol⁻¹.

El ibuprofeno abatió la temperatura de transición e incrementó el intervalo de transición de la bicapa lipídica con respecto al fosfolípido puro (de 40.85 a 38.98 °C), indicando baja cooperatividad (es decir el número de moléculas que están bajo la misma transición al mismo tiempo), en la transición de fase; T1/2 cambia de 0.98 a 2.18 °C. No se aprecia la formación de dominios, esto quiere decir que el ibuprofeno se distribuye homogéneamente en la bicapa lipídica. La presencia de ibuprofeno afecta el empaquetamiento de los fosfolípidos (elimina la pre-transición al afectar la inclinación de los fosfolípidos con respecto al plano de la bicapa). Como se menciona, el IBU hace que la Tm disminuya, esto se debe a que afecta la transición de fase de gel a cristal-líquido, es decir de la forma rígida (fase gel donde los lípidos están en conformación trans) a la fase fluida (fase cristal líquido donde los lípidos están en orientación gauche). El incremento de T1/2 se debe a que la interacción molecular entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos y los anillos aromáticos y el grupo sec-butilo del ibuprofeno interactúan fuertemente Fig. 4.5e.

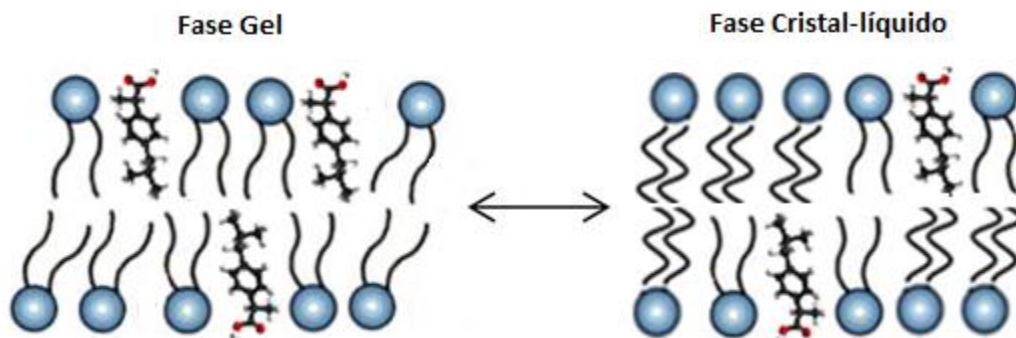


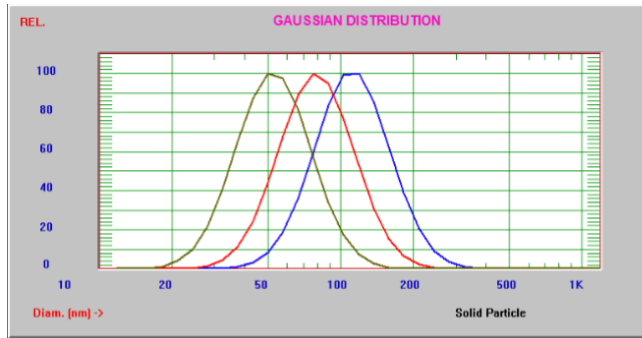
Fig. 4.5e. Se muestra cómo en la fase $L\beta$, el IBU interacciona con los fosfolípidos vecinos modificando la inclinación y el empaquetamiento de los mismos. En la fase $L\alpha$, los fosfolípidos que se encuentran interaccionando con el IBU son los únicos que no presentan el cambio de fase, pero no se presentan dominios de IBU en la membrana.

4.6 SISTEMA DPPC (10mM)/IBU (8:1) + NGP (4mM)]

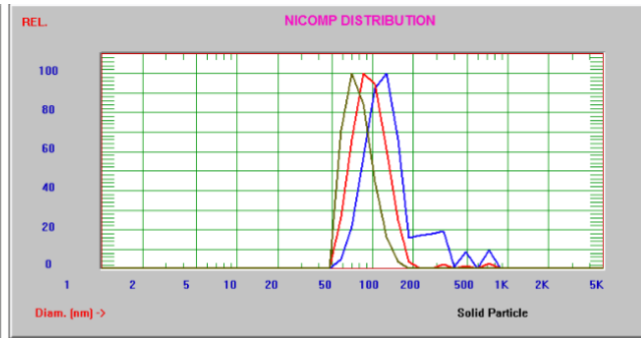
4.6.1 DLS, SEM y TEM

Una solución de DPPC (10mM)/IBU (8:1) fue añadida a una solución acuosa 4 mM de NGP en un calorímetro TAM. Se colocaron 2ml de una solución acuosa 4mM de NGP en la celda y se hicieron 30 adiciones de 25µl de DPPC (10mM)/CHOL (4:1) a 298.15K. El calor involucrado en este proceso fue monitoreado y posteriormente analizado con la finalidad de determinar la constante de partición como se detalla más adelante. Al término de las adiciones la solución resultante [DPPC (2.75mM)/IBU (8:1) + NGP (2.9)] fue analizada por DLS, TEM y SEM

La figura 4.6a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/IBU (8:1) + NGP (2.9) determinada por DLS. El D_h promedio es 118.5 ± 42.3 nm, sugiriendo que el NGP se introdujo en las estructuras formadas por DPPC: IBU descritas anteriormente. La presencia del IBU encapsulado estabiliza las estructuras formadas y esto se ve reflejado en el mantenimiento del tamaño de partícula. La figura 4.6b muestra la distribución Nicomp por intensidad donde se observan dos poblaciones, una de 121.5 nm 83.89% y otra de 382.6nm que representa el 16.11%.



Intensity Wt:	—	Volume Wt:	—
<i>Intensity Wt:</i>			
Mean Diameter	= 118.5 nm		
Std Deviation	= 42.3 nm (35.70 %)		



Number Wt:	—		
<i>Intensity Wt:</i>			
Mean Diam.[nm]	121.5	382.6	—
Percent [%]	83.89	16.11	—

Fig. 4.6a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/IBU (8:1) + NGP (2.9)

Fig. 4.6b. Distribución Nicomp de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/IBU (8:1) + NGP (2.9)

La SEM arrojó para estos sistemas la imágenes presentadas en las figuras 4.6c (a, b y c) en las que se puede observar la presencia de estructuras esféricas. La TEM arrojó las imágenes presentadas en las figura 4.6c (d, e y f) en las cuales se puede observar la formación de estructuras en forma de conglomerados de liposomas y también permanecen liposomas aislados de menor tamaño que corresponden probablemente a las estructuras detectadas en DLS mediante la distribución Nicomp. Los resultados obtenidos sugieren que el NGP se inserta en los Liposomas formados por DPPC/CHOL dando origen a conglomerados pero también subsisten estructuras esféricas.

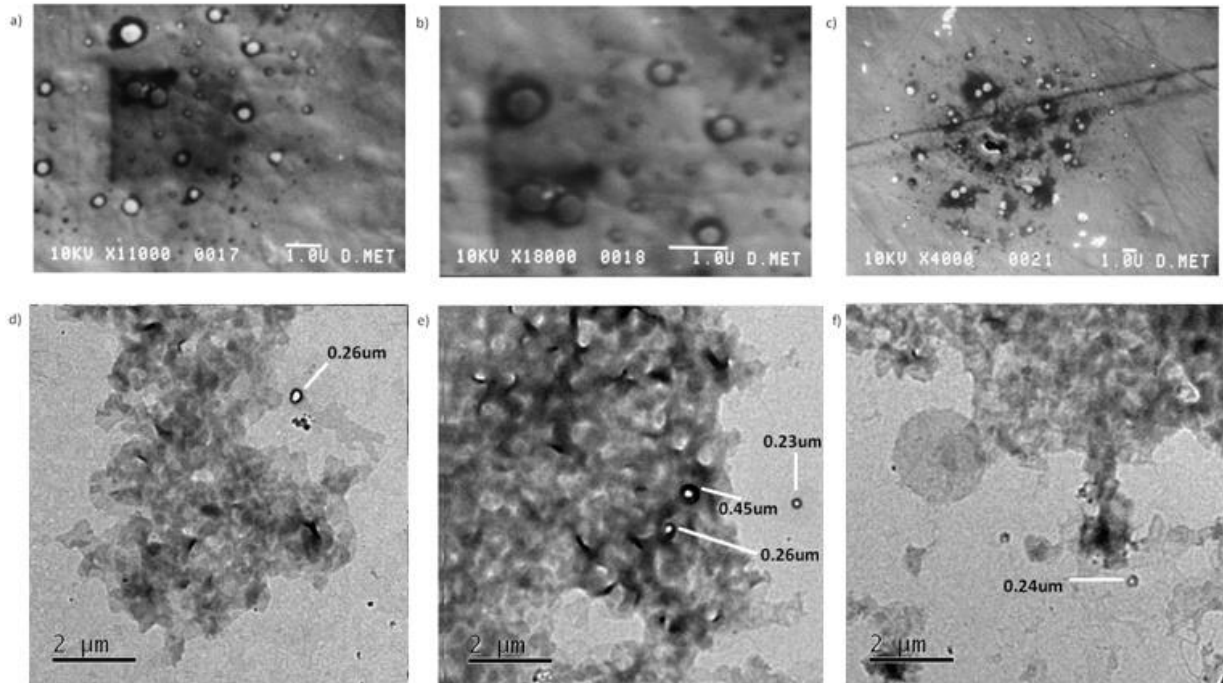


Fig. 4.6c. Microscopía electrónica de Barrido, SEM (a, b y c) y la microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM) /IBU (8:1) con NGP insertado. Se observan diversas estructuras en forma de esfera y conglomerados.

En la figura 4.6d, se presenta el termograma obtenido por DSC que compara el sistema DPPC: IBU/NGP con el DPPC/IBU.

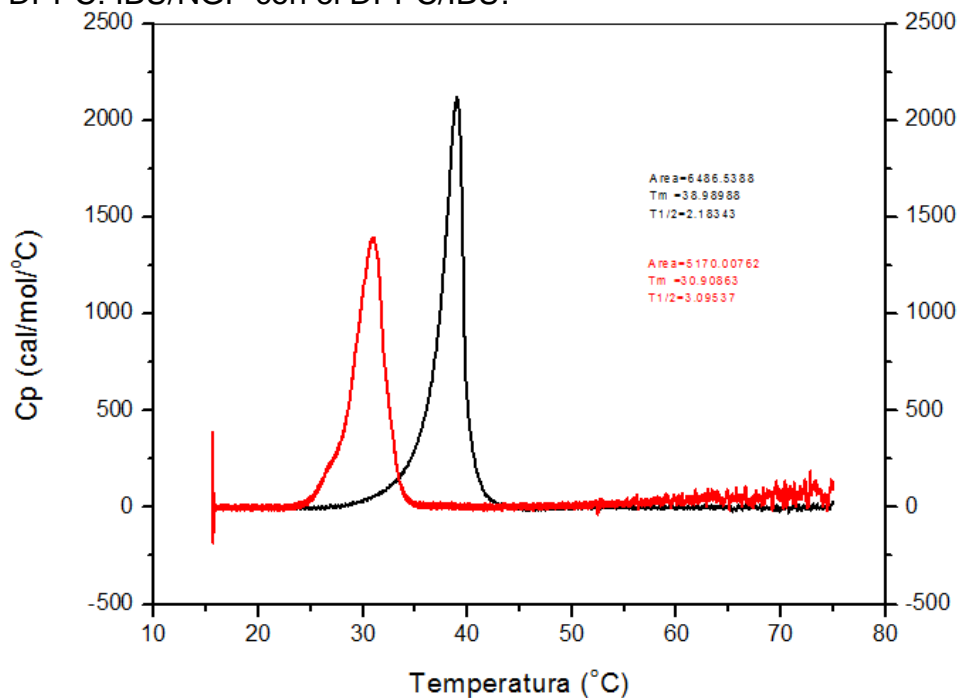


Fig. 4.6d. Termograma de liposomas de DPPC: IBU y DPPC: IBU/NGP. En negro se muestran los liposomas de DPPC: IBU y en rojo en presencia de NGP.

Como se puede apreciar, la partición del NGP en los liposomas puros perturba su estructura, debido a que el NGP causa una alteración del orden estructural de las cadenas alifáticas sin interactuar específicamente con el IBU o los fosfolípidos, es decir no existe en la bicapa lipídica dominio alguno (fig. 4.6e). La fig. 4.9b, muestra los cambios ocurridos al añadir NGP al sistema DPPC: IBU. La entalpía (ΔH) disminuye de 6.49 kcal/mol a 5.17 kcal/mol, dado que ΔH es el área bajo la curva (la energía necesaria para fundir los fosfolípidos). La cooperatividad, caracterizada por $T_{1/2}$, disminuye, ya que ésta pasa de 2.18 a 3.09 °C, es decir, la transición principal es menos cooperativa (mayor $T_{1/2}$), esto indica que se requiere mayor energía para que se lleve a cabo la transición de la fase gel a la líquido-cristalina, esto viene acompañado también de un decremento en el ΔS que pasa de 20.78 a 17.0 kcal K⁻¹ mol⁻¹, disminuye el número de microestados del sistema, se torna más ordenado. En cuanto a la transición principal (T_m), se observa un abatimiento de 39.98°C a 30.90°C, esto se debe a la pérdida de orden en la membrana y al cambio de la inclinación de los fosfolípidos que acompaña a esta transición, por lo que se presenta una pérdida de la estabilidad térmica (menor T_m).

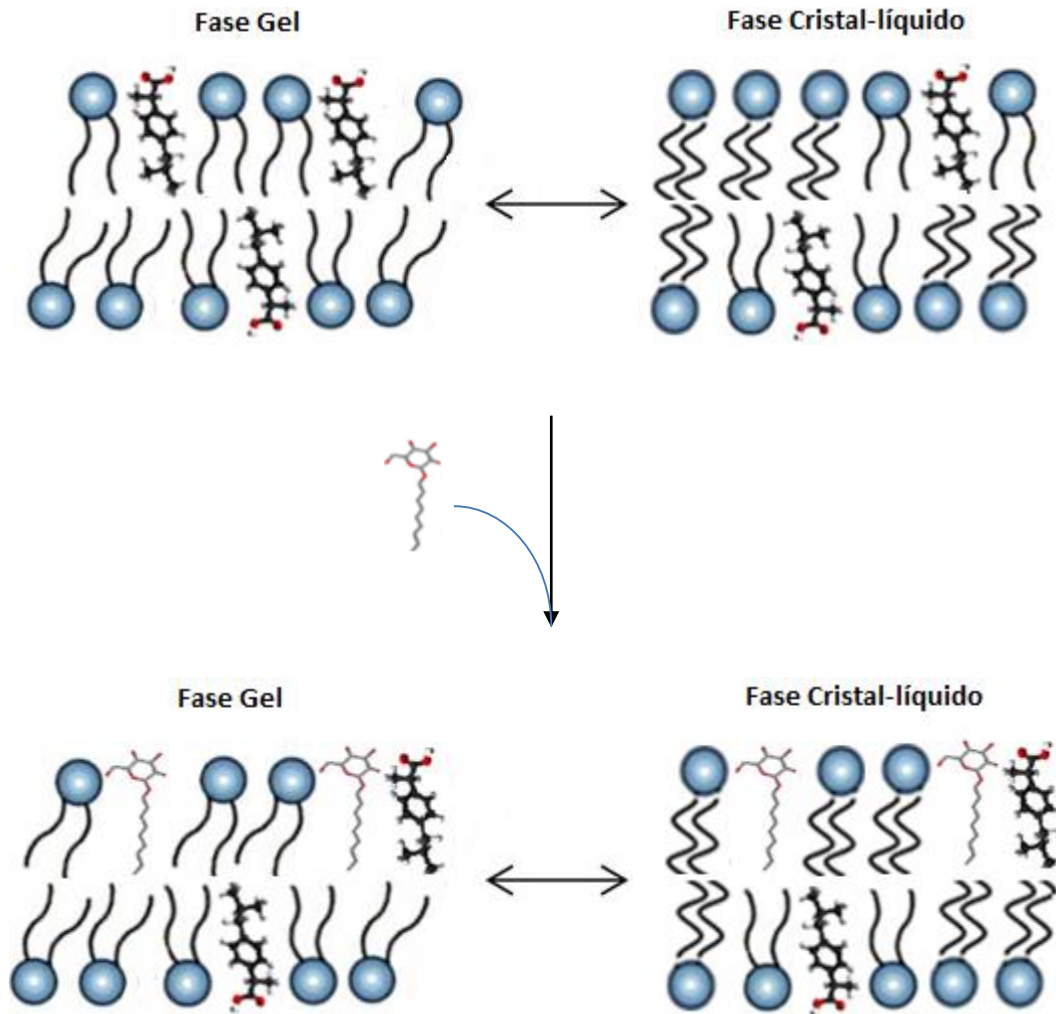


Fig. 4.6e. Se muestra cómo en la fase $L\beta$, el IBU interacciona con los fosfolípidos vecinos modificando la inclinación y el empaquetamiento de los mismos, en tanto que la presencia de NGP no impide la transición de los fosfolípidos vecinos a la siguiente. En la fase $L\alpha$, los fosfolípidos que se encuentran interaccionando con el IBU son los únicos que no presentan el cambio de fase, y los que están asociados al NGP, siguen su transformación de fase. Nuevamente no se presentan dominios de IBU en la membrana.

Estos parámetros sugieren que el NGP es capaz de penetrar en la membrana. Una medida cuantitativa de este fenómeno es la K de partición, cuya gráfica se muestra en la figura 4.6g y que resultó ser de 1.68 mM^{-1} .

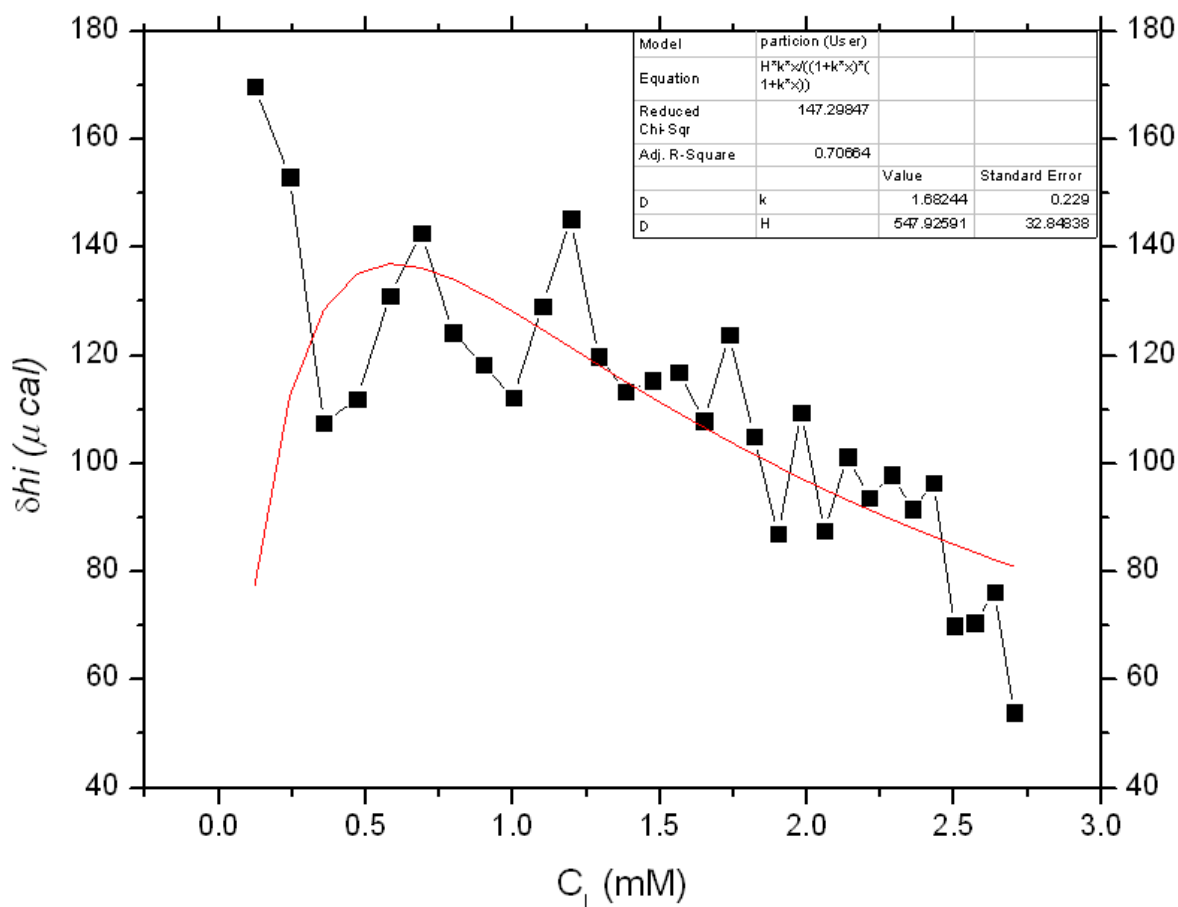


Fig. 4.4f. Entalpograma del nonil- β -D-glucopiranosido con vesículas extrudidas de DPPC (10mM)/IBU (8:1) a pH 7.2. Cada cuadro negro corresponde a la inyección de 25 μ l de suspensión de lípido dentro de la celda de reacción ($V_{\text{celda}} = 2 \text{ ml}$ de NGP 4mM), y los círculos rojos denotan la predicción teórica, calculados con el modelo de partición: concentración de NGP $C_D = 4 \text{ mM}$, $K = 1.68 \text{ mM}^{-1}$, $\Delta H^0 = 68.49 \text{ } \mu\text{cal mmol}^{-1}$ de donde K y ΔH^0 fueron ajustados para proveer una curva óptima de la parte suave de la curva de titulación, definida en la parte final de la titulación experimental. Recordando que este tipo de patrón de titulación (más compleja) posee 3 regiones, donde la región 3 (que en este caso no está claramente definida) corresponde al fenómeno de partición. Todos los calores denotan reacciones endotérmicas dado que son positivos.

4.7 SISTEMA DPPC CHOL IBU (14.1:1.7:1)

4.7.1 DLS, SEM y TEM

La figura 4.7a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/IBU/CHOL determinada por DLS. El D_h promedio es 110.0 ± 43.4 nm. La figura 4.7b presenta la distribución Nicomp que muestra la presencia de dos poblaciones, una de alrededor de 111.7 nm que representa el 98.04 % de las partículas y otra de 29.96 nm que representa el 1.96%.

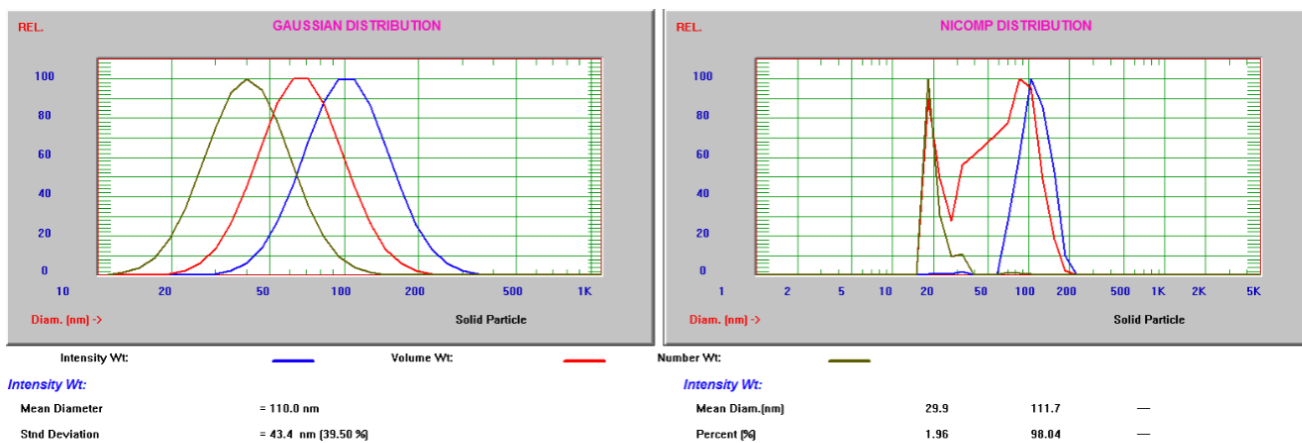


Fig. 4.7a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/IBU/CHOL

Fig. 4.7b Distribución Nicomp del tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (10mM)/IBU/CHOL

La SEM arrojó para estos sistemas la imágenes presentadas en las figura 4.7c (a, b y c) en las que se puede observar la presencia de liposomas fusionados. En el caso de SEM, debido a las características de la técnica y a la manipulación de la muestra, se aprecian en la superficie conglomerados, mientras que en el fondo parece apreciarse haber liposomas más pequeños que corresponderían a los detectados en DLS.

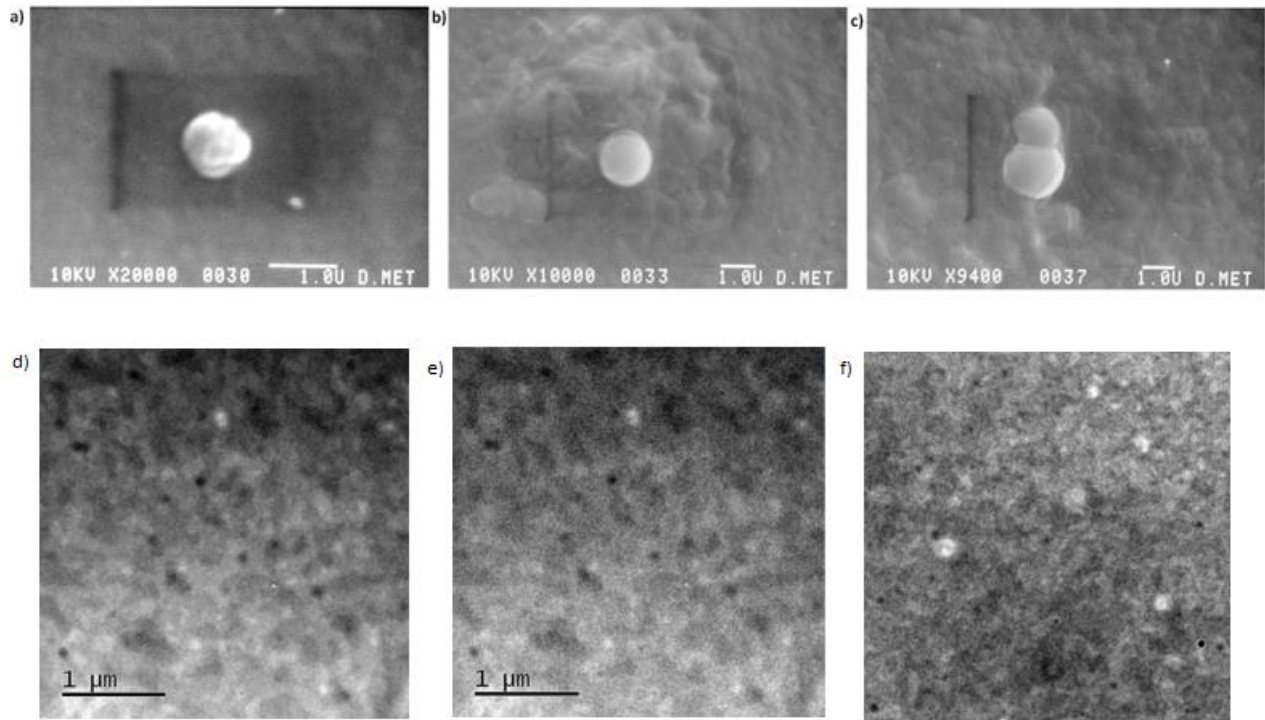


Fig. 4.7c. Microscopia electrónica de barrido (a,b y c) y la microscopía electrónica de transmisión TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM): CHOL: IBU con NGP insertado. Se observan diversas estructuras en forma de esfera y conglomerados.

En la fig. 4.7d, se presenta el termograma obtenido por DSC para el sistema DPPC: CHOL: IBU

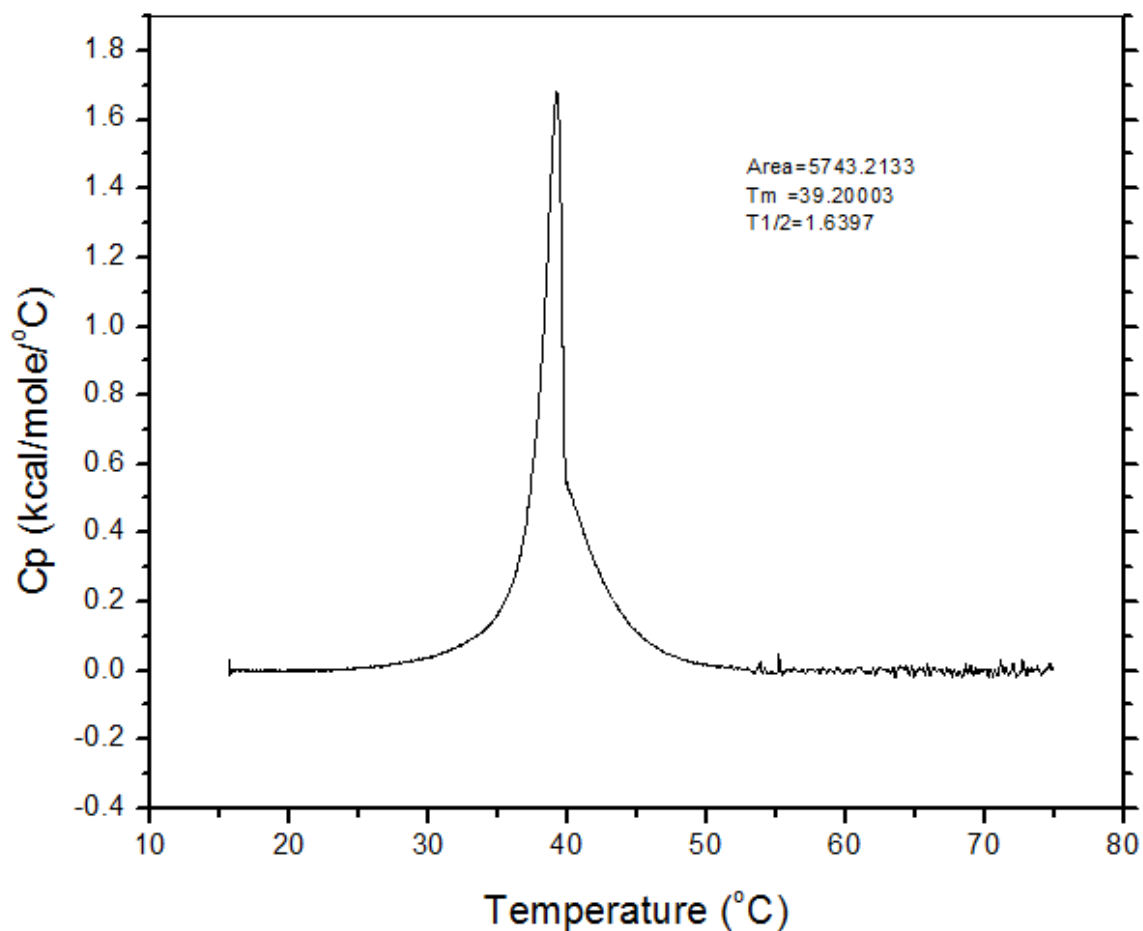


Fig. 4.7c. DSC del sistema DPPC: CHOL: IBU. Sus parámetros termodinámicos son: $T_m = 39.02\text{ }^\circ\text{C}$, el $\Delta H = 5.74\text{ kcal mol}^{-1}$, $T_{1/2} = 1.63$ y el $\Delta S = 18.39\text{ cal K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$.

Como se menciona anteriormente el IBU abatió la temperatura de transición de 40.85 a $38.98\text{ }^\circ\text{C}$ y el CHOL la abatió de 40.85 a $39.09\text{ }^\circ\text{C}$ al agregarlos a la solución acuosa de DPPC puro. Cuando se agregan simultáneamente IBU y CHOL en la membrana, la T_m resulta ser $39.20\text{ }^\circ\text{C}$. Esto quiere decir que al estar presente el IBU y el CHOL en la membrana se tiene un efecto estabilizador, pues la T_m es mayor que cuando sólo posee alguno de los dos componentes. La cooperatividad disminuye cuando se agregan IBU y CHOL al DPPC ($T_{1/2}$ cambia de 0.98 a 1.63

°C) es decir el número de moléculas que están bajo la misma transición al mismo tiempo están en menor cantidad en la bicapa. Cuando solamente se agrega CHOL, $T_{1/2}$ es de 6.49 °C; mientras que cuando se añade solamente IBU $T_{1/2}$ es de 2.18 °C. La presencia simultánea de IBU y CHOL, no causa una alteración fuerte del orden estructural de las cadenas alifáticas en la transición de fase como la que causan el IBU y el CHOL separadamente. En este sistema se aprecia la formación de dominios que ya también se había presentado en el sistema DPPC: CHOL, pero no en el sistema DPPC: IBU. Esto quiere decir que el dominio que se observa en el termograma de DPPC: CHOL: IBU se debe a la presencia de CHOL exclusivamente (el CHOL se distribuye en balsas, es decir no homogéneamente). Esto quiere decir que el ibuprofeno se distribuye homogéneamente en la bicapa lipídica. La presencia de IBU y CHOL sigue afectando el empaquetamiento de los fosfolípidos (elimina la pre-transición al afectar la inclinación de los fosfolípidos con respecto al plano de la bicapa).

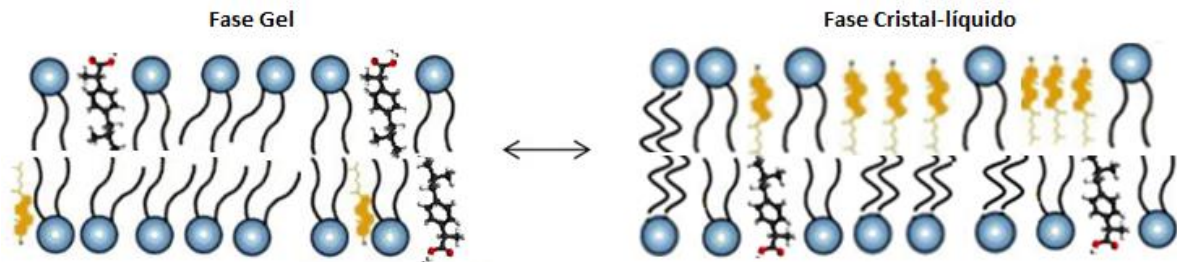


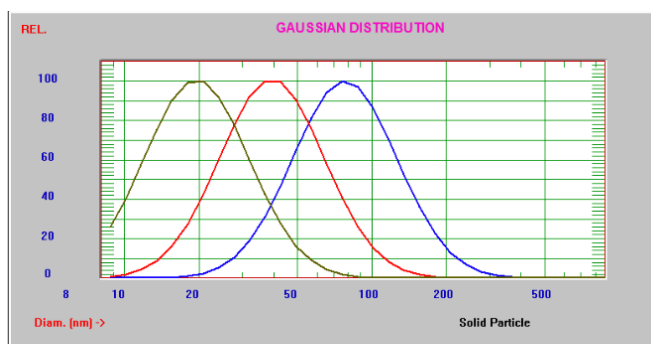
Fig. 4.7d. Se muestra en la fase L_{β} , cómo el IBU y el CHOL interaccionan con los fosfolípidos vecinos modificando la inclinación y el empaquetamiento de los mismos. En la fase L_{α} , los fosfolípidos que se encuentran interaccionando con el IBU y el CHOL no pasaran a la fase L_{α} .

4.8 [SISTEMA DPPC (10mM)/CHOL/IBU (8:1.7:1)+ NGP (4mM)]

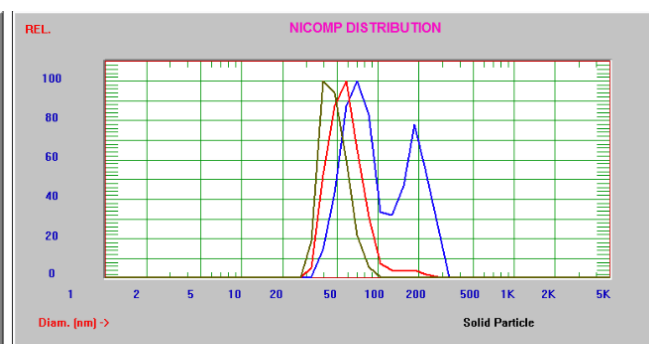
4.2.1 DLS, SEM y TEM

Una solución de DPPC (10mM)/IBU/CHOL fue añadida a una solución acuosa 4mM de NGP en un calorímetro TAM. Se colocaron 2ml de una solución acuosa 4mM de NGP en la celda y se hicieron 30 adiciones de 25µl de DPPC (10mM)/IBU/CHOL a 298.15K. El calor involucrado en este proceso fue monitoreado y posteriormente analizado con la finalidad de determinar la constante de partición como se detalla más adelante. Al término de las adiciones la solución resultante [DPPC (2.75mM)/IBU/CHOL + NGP (2.9mM)] fue analizada por DLS, TEM y SEM

La figura 4.8a, muestra la distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/IBU/CHOL + NGP (2.9mM) determinada por DLS. El D_h promedio es 87.4 ± 42.5 nm. Se observa que el D_h disminuyó, sugiriendo que el NGP se introdujo en las estructuras formadas por DPPC descritas anteriormente y haciendo que éstas se fraccionaran en vesículas más pequeñas. La figura 4.8b muestra la distribución Nicomp por intensidad en donde se aprecian dos poblaciones, una alrededor de 190.6nm que representa el 43.88% de las partículas y otra de 71.6nm que representa el 56.12%.



Intensity Wt:
Mean Diameter = 87.4 nm
Std Deviation = 42.5 nm (48.60 %)



Intensity Wt:
Mean Diam.(nm) = 71.6, 190.6
Percent (%) = 56.12, 43.88

Fig. 4.8a. Distribución Gaussiana de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/IBU/CHOL + NGP (2.9mM)

Fig. 4.8b. Distribución Nicomp de tamaño de partícula por intensidad del sistema DPPC (2.75mM)/IBU/CHOL + NGP (2.9mM)

La SEM arrojó para estos sistemas la imágenes presentadas en las figuras 4.8.c (a, b y c) en las que se puede observar la presencia de estructuras esféricas e irregulares que concuerdan con los datos obtenidos por DLS. La TEM arrojó las imágenes presentadas en las figuras 4.8 (d, e y f) en las cuales se puede observar vesículas mixtas aisladas que corresponden probablemente a las estructuras detectadas en DLS mediante la distribución Nicomp. Los resultados obtenidos sugieren que el NGP se inserta en los Liposomas formados por DPPC dando origen a vesículas mixtas. Es posible que el fármaco y el colesterol tengan un efecto sinérgico en la estabilidad de la membrana.

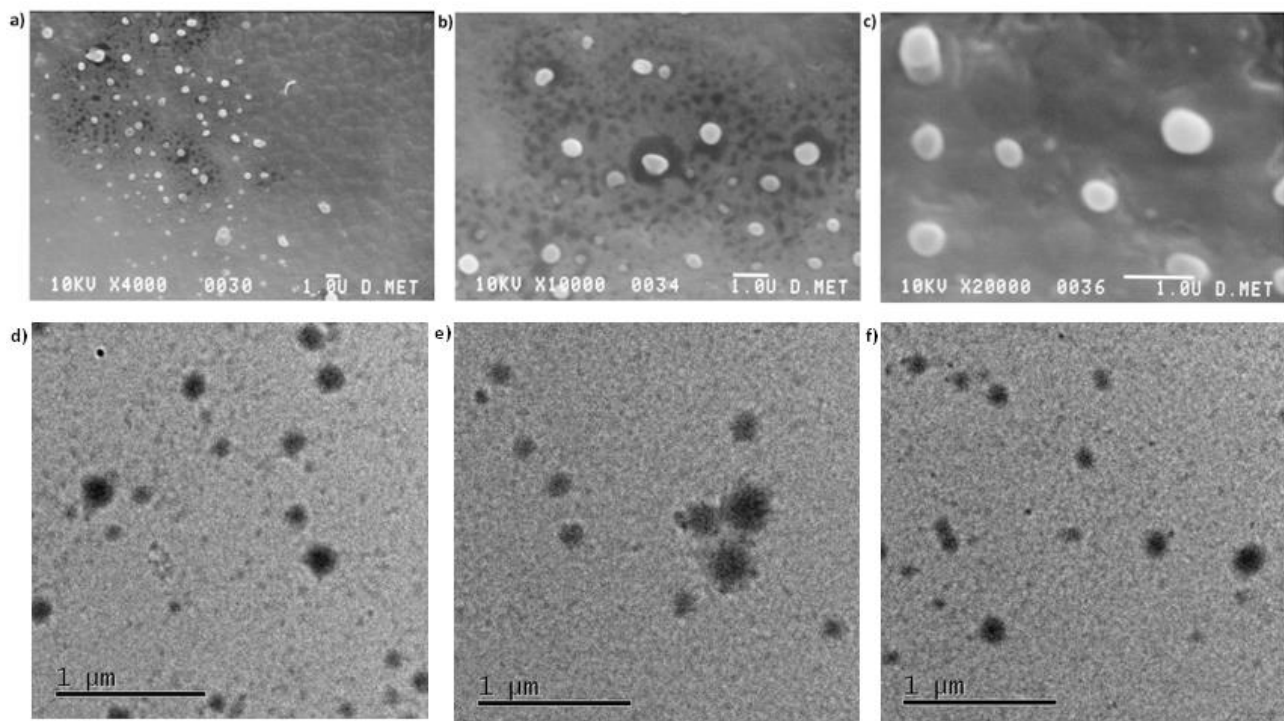


Fig. 4.8d. Microscopía electrónica de Barrido, SEM (a, b y c) y la microscopía electrónica de transmisión, TEM (d, e y f) del sistema de DPPC (10mM): CHOL: IBU (8:1.7:1) con NGP insertado. Se observan diversas estructuras en forma de esfera y conglomerados.

En la fig. 4. 8e, se presenta el termograma obtenido por DSC que compara el sistema DPPC: CHOL: IBU /NGP con el DPPC: CHOL:IBU.

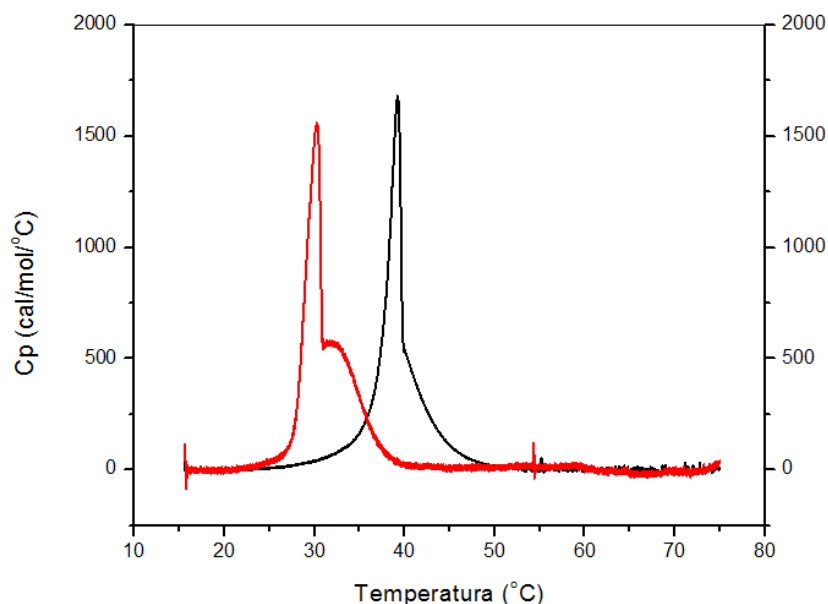


Fig. 4.8e. Termograma de liposomas de DPPC:CHOL:IBU y DPPC:CHOL:IBU:NGP. En negro se muestran los liposomas de DPPC: CHOL: IBU y en rojo en presencia de NGP.

Como se puede apreciar en la fig. 4.8e, la partición del NGP en los liposomas de DPPC:CHOL:IBU es preferente sobre los dominios de CHOL, ya que el hombro que se aprecia en el sistema DPPC:CHOL:IBU se hace más grande cuando se le adiciona el NGP fig. 4.8f. En cuanto a la transición principal (T_m), se observa un abatimiento de 39.98 °C a 30.90 °C, esto se debe a la pérdida de orden en la membrana y al cambio de la inclinación de los fosfolípidos que acompaña a esta transición, por lo que se presenta una pérdida de la estabilidad térmica (menor T_m), esto se debe tal vez a las fuerzas repulsivas entre las cabeza de los fosfolípidos, el carboxilo del IBU y la interacción de las cadenas hidrocarbonadas del NGP selectivamente con los anillos aromáticos del IBU y no con las cadenas de acilo, por lo que crea un impedimento estérico que desestabiliza la membrana. Estos parámetros sugieren que el NGP es capaz de penetrar en la membrana con un valor de la K de partición de 5.47 mM^{-1} (fig. 4.8g) el cual es mayor cuando el NGP se

añade al DPPC puro (poner el valor), pero menor en presencia de un sólo componente, IBU o CHOL, ya que el IBU y el CHOL le confieren estabilidad a la membrana. La entalpía (ΔH) incrementa de $5.73 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $5.90 \text{ kcal mol}^{-1}$, dado que ΔH es el área bajo la curva (la energía necesaria para fundir los fosfolípidos). La cooperatividad, caracterizada por $T_{1/2}$, disminuye (recordar que la cooperatividad es inversa a $T_{1/2}$), ya que ésta pasa de 1.63 a $1.88 \text{ }^\circ\text{C}$, es decir, la transición principal es menos cooperativa (mayor $T_{1/2}$), esto indica que se requiere mayor energía para que se lleve a cabo la transición de la fase gel a la líquido-cristalina, esto viene acompañado también de un incremento en el ΔS que pasa de $18.39 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ a $19.45 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, aumenta el número de microestados del sistema, aumenta el desorden fig. 4.9b.

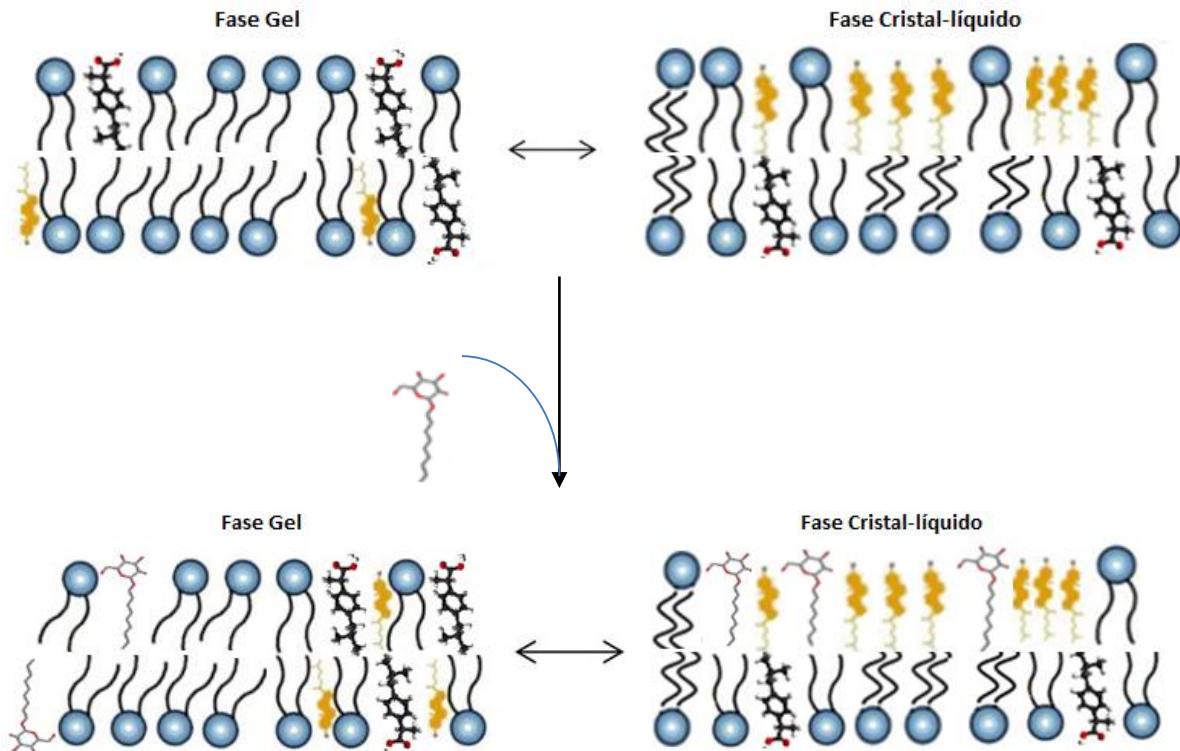


Fig. 4.8f. Se muestra en la fase $L\beta$, cómo el IBU y el CHOL interactúan con los fosfolípidos vecinos modificando la inclinación y el empaquetamiento de los mismos, mientras que el NGP mantiene una interacción más débil con los mismos, comportándose casi como un fosfolípido. En la fase $L\alpha$, los fosfolípidos que se encuentran interactuando con el IBU y el CHOL son los únicos que no presentan el cambio de fase, además, en la fase $L\alpha$ se presentan los dominios del CHOL que interactúan preferentemente con los fosfolípidos; en presencia de NGP se hace más evidente este hombro, pues como se describió el NGP tiene afinidad por los dominios de CHOL.

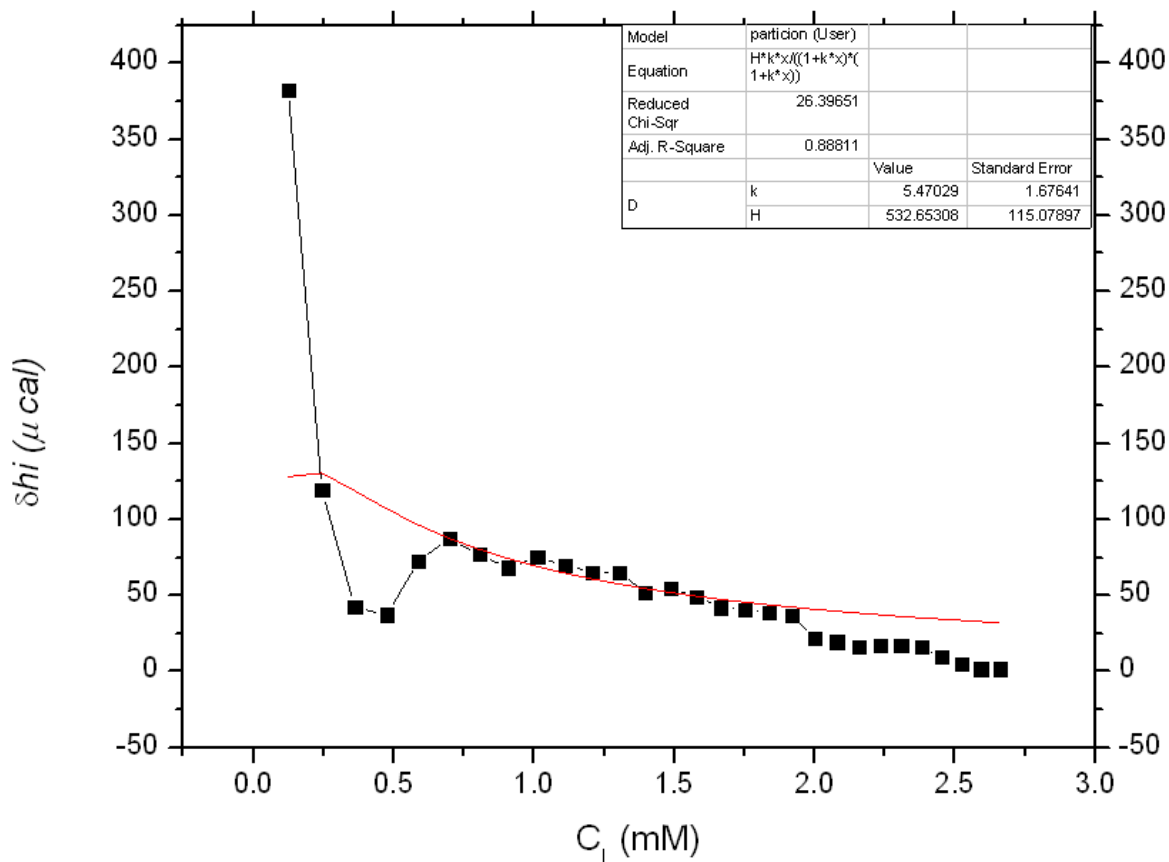


Fig. 4.4g. Entalpograma del nonil- β -D-glucopiranosido con vesículas extrudidas de DPPC (10mM)/CHOL/IBU (8:1.7:1) a pH 7.2. Cada cuadro negro corresponde a la inyección de 25 μ l de suspensión de lípido dentro de la celda de reacción ($V_{\text{celda}} = 2$ ml de NGP 4mM), y los círculos rojos denotan la predicción teórica, calculados con el modelo de partición: concentración de NGP $C_D = 4$ mM, $K = 5.47$ mM^{-1} , $\Delta H^0 = 66.58$ $\mu\text{cal mmol}^{-1}$. De donde K y ΔH^0 fueron ajustados para proveer una curva óptima de la parte suave de la gráfica correspondiente a la parte final de la titulación. Recordando que este tipo de patrón de titulación (más compleja) posee 3 regiones, donde la región 3 corresponde al fenómeno de partición. Todos los calores denotan reacciones endotérmicas dado que son positivos.

4.9 Resumen de parámetros fisicoquímicos

EFFECTO SOBRE EL D_h

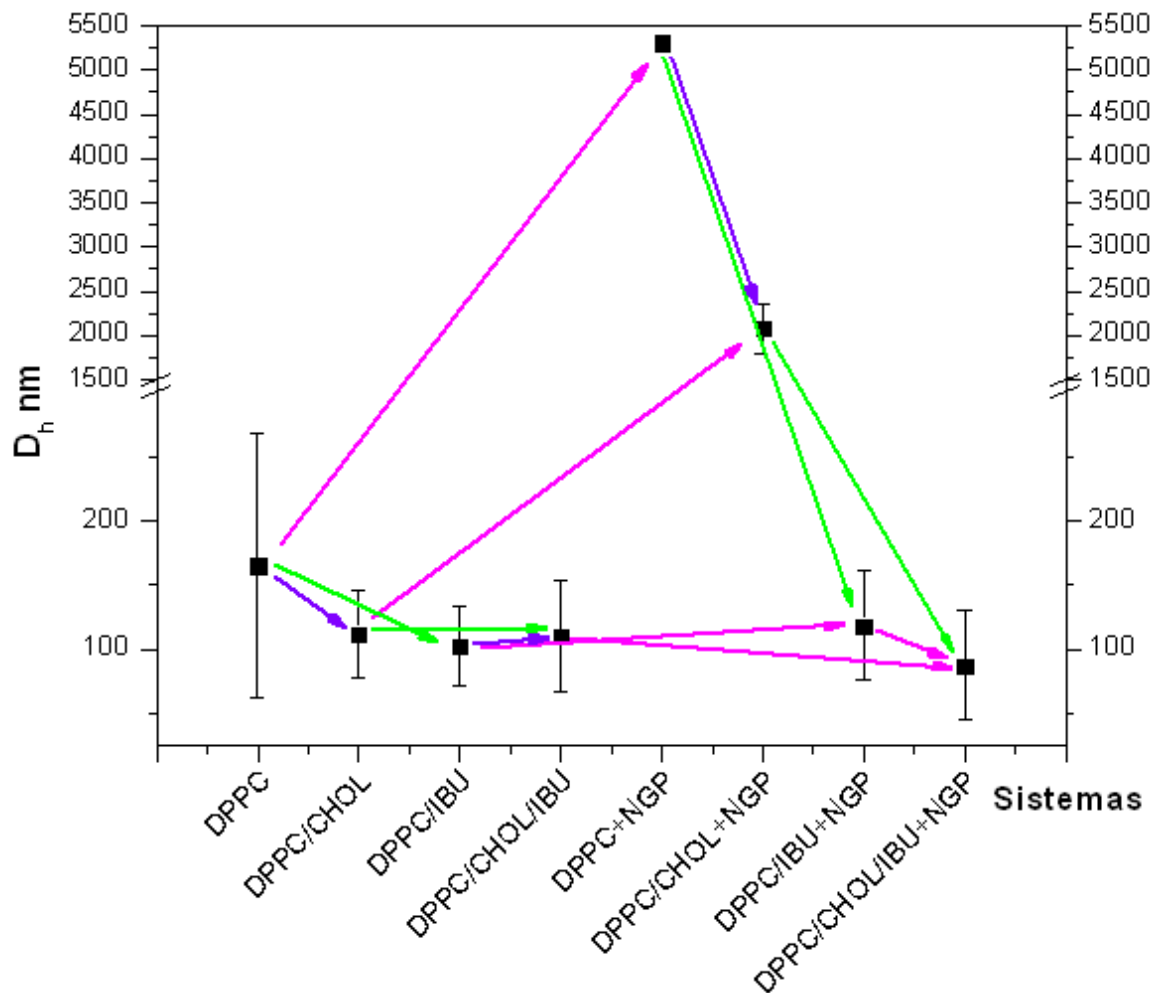


Fig. 4.9a. Efecto de la presencia de: NGP, CHOL e IBU en la bicapa lipídica.

La fig. 4.9a y la tabla 4.9a, muestra el D_h determinado por DLS utilizando la distribución Gaussiana para cada uno de los sistemas estudiados en este trabajo a 298.15K. La tabla 4.9b muestra el D_h por DLS utilizando la distribución Nicomp para los mismos sistemas a la misma temperatura.

Se fabricaron liposomas únicamente con DPPC en agua y se observó que éstos son muy inestables (fig. 4.0a y 4.0b).

Efecto de la adición de Chol

La adición de colesterol en todos los sistemas induce la formación de vesículas esféricas. La ausencia de CHOL en las formulaciones favorece el proceso de agregación de las estructuras. Este factor ha sido corroborado por otros autores, el CHOL tiene un efecto estabilizador en la bicapa lipídica. Si bien en la fig. 4.9a, no se observa una diferencia significativa de D_h en los sistemas: DPPC, DPPC:IBU, DPPC:NGP y DPPC:IBU:NGP; ésta es muy clara en las microscopias SEM y sobre todo TEM, donde las poblaciones de los sistemas sin CHOL varían aleatoriamente de tamaño, en cambio, aquéllos que contienen colesterol permanecen mono-dispersos. Los resultados observados en este monitoreo se presentan en la tabla 4.9a.

Efecto de la adición de NGP.

Como se describió anteriormente, se determinó el tamaño de partícula para los sistemas DPPC, DPPC:CHOL, DPPC:IBU y DPPC:CHOL:IBU; posteriormente una solución de NGP fue titulada con cada una de las suspensiones anteriores. Los estados iniciales y finales de estos procesos están señalados en la fig. 4.9a, con líneas y flechas color magenta. La fig. 4.9b, muestra los resultados obtenidos para el coeficiente de partición del NGP.

Como se puede observar en la fig. 4.9a y tabla 4.9a, la distribución gaussiana muestra que la adición de NGP a DPPC y DPPC:CHOL incrementa apreciablemente el tamaño de los liposomas, debido a que se parte de un sistema formado por liposomas esféricos y la presencia de NGP hace que se formen conglomerados de liposomas. En el caso de los sistemas DPPC:IBU y DPPC:CHOL:IBU se puede considerar que el D_h se mantiene prácticamente constante, debido a la estabilidad que el IBU confiere a las partículas. El análisis hecho hasta ahora tomando los datos que arroja la distribución Gaussiana no aclara la conveniencia de agregar NGP en la formulación, sin embargo la distribución Nicomp nos da más información; para el caso del sistema DPPC:CHOL:IBU:NGP, se presentan dos poblaciones, una de las cuales es de 75 nm que corresponde aproximadamente al 50%, es decir, se forman

esferas menores a 100 nm con el fármaco encapsulado, lo cual les confiere baja inmunidad, por lo que únicamente se requeriría centrifugar para utilizar las más pequeñas. Los resultados del coeficiente de partición indican que en estos sistemas el NGP se ha introducido en la membrana (fig. 4.9b), en donde la K de partición es de 5.47 mM^{-1} , menor a aquella de los sistemas de DPPC:CHOL:NGP y DPPC:IBU:NGP que tienen una K de 1.45 y 1.68 mM^{-1} respectivamente. En cuanto al sistema DPPC:CHOL:NGP la magnitud del D_h es de μm , mientras que para el sistema DPPC:IBU si bien el D_h es alrededor de 100 nm, después de los 7 días se aprecia separación de fases. Por todo lo anterior, el sistema DPPC:CHOL:IBU:NGP es más promisorio para ser utilizado en un formulación. En la fig. 4.9c, se muestra el aspecto físico de los sistemas después de titular con NGP.

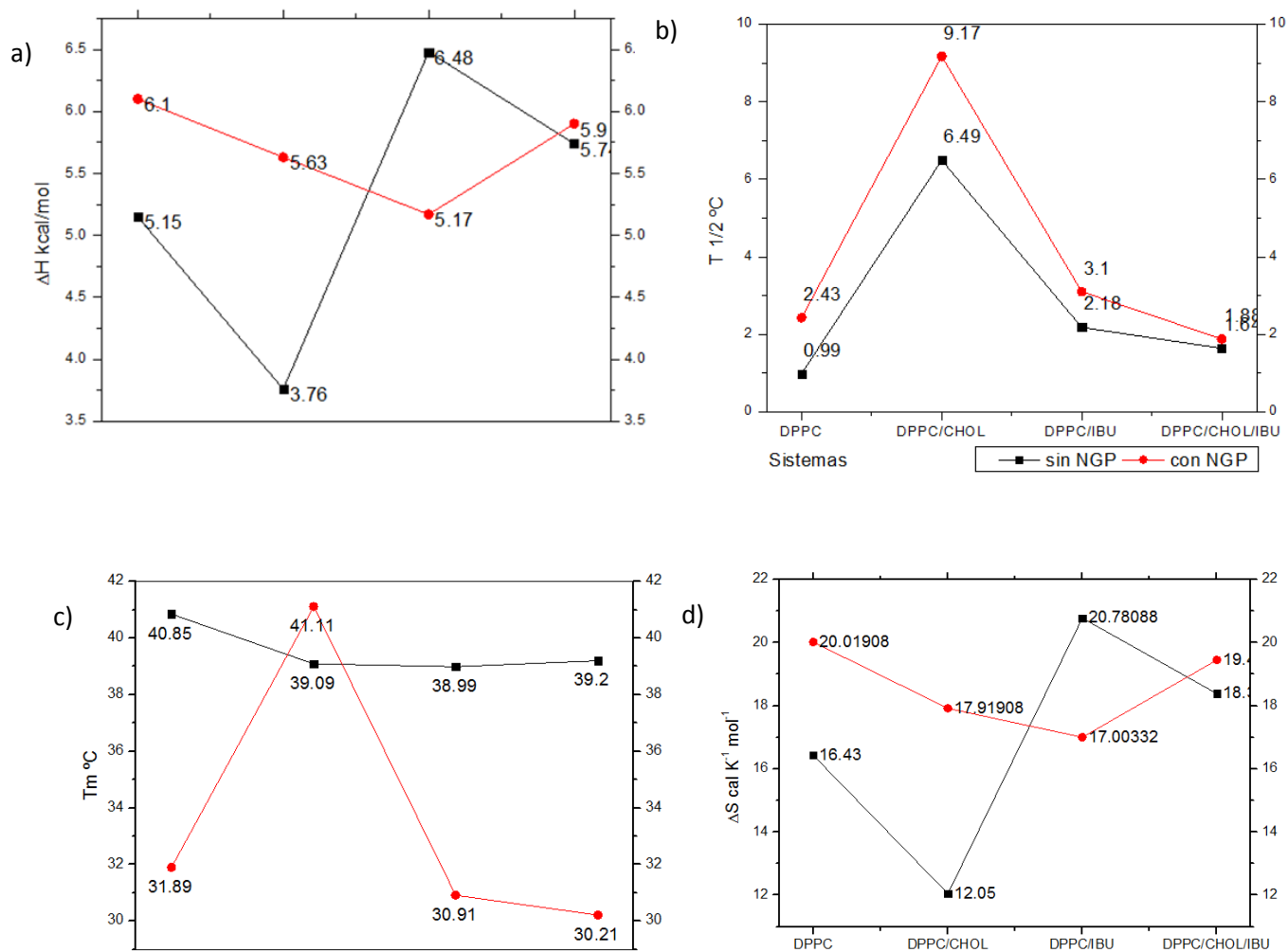
Distribución Nicomp.				
Liposomas composición.	D_h (nm) sin NGP	Porcentaje (%)	D_h (nm) + NGP	Porcentaje (%)
DPPC	55.6	14.97	112.2	31.13
	184	85.03	3761.4	68.87
DPPC/CHOL	35.9	4.85	2212.8	--
	125.3	95.15	100	--
DPPC/IBU	108.4	--	121.5	83.89
	100	--	382.6	16.11
DPPC/CHOL/IBU	29.9	1.96	71.6	190.6
	111.7	98.04	190.6	43.88

Tabla 4.9a. Distribución gaussiana de los sistemas antes y después de titular con NGP.

Liposomas composición.	Distribución Gaussiana	
	D _h (nm) sin NGP	D _h (nm) + NGP
DPPC	165.1 ± 102.36 (62.0%)	5304.9 ± 6185.7 (116.6%)
DPPC/CHOL	112.2 ± 33.9 (30.2 %)	2078.1 ± 284.7 (13.7%)
DPPC/IBU	102.7 ± 31.4 (30.6%)	118.5 ± 42.3 (35.7%)
DPPC/CHOL/IBU	110.0 ± 43.4 (39.5%)	87.4 ± 42.5 (48.6%)

Tabla 4.9b. Distribución Nicomp de los sistemas antes y después de titular con NGP.

EFFECTO SOBRE LAS TRANSICIONES DE FASE



4.9b. Datos termodinámicos obtenidos a través de DSC para los sistemas antes y después de titular con NGP. En negro se marca el sistema en ausencia de NGP (antes de la titulación), y en rojo se marca el sistema en presencia de NGP (después de titular). a) El ΔH en kcal mol⁻¹ de la transición de fase de $p\beta \rightarrow L\alpha$, b) la T_m de la transición de fase, c) el $T_{1/2}$ o la cooperatividad de la transición de fase, y d) el ΔS de la transición de fase evaluado en T_m .

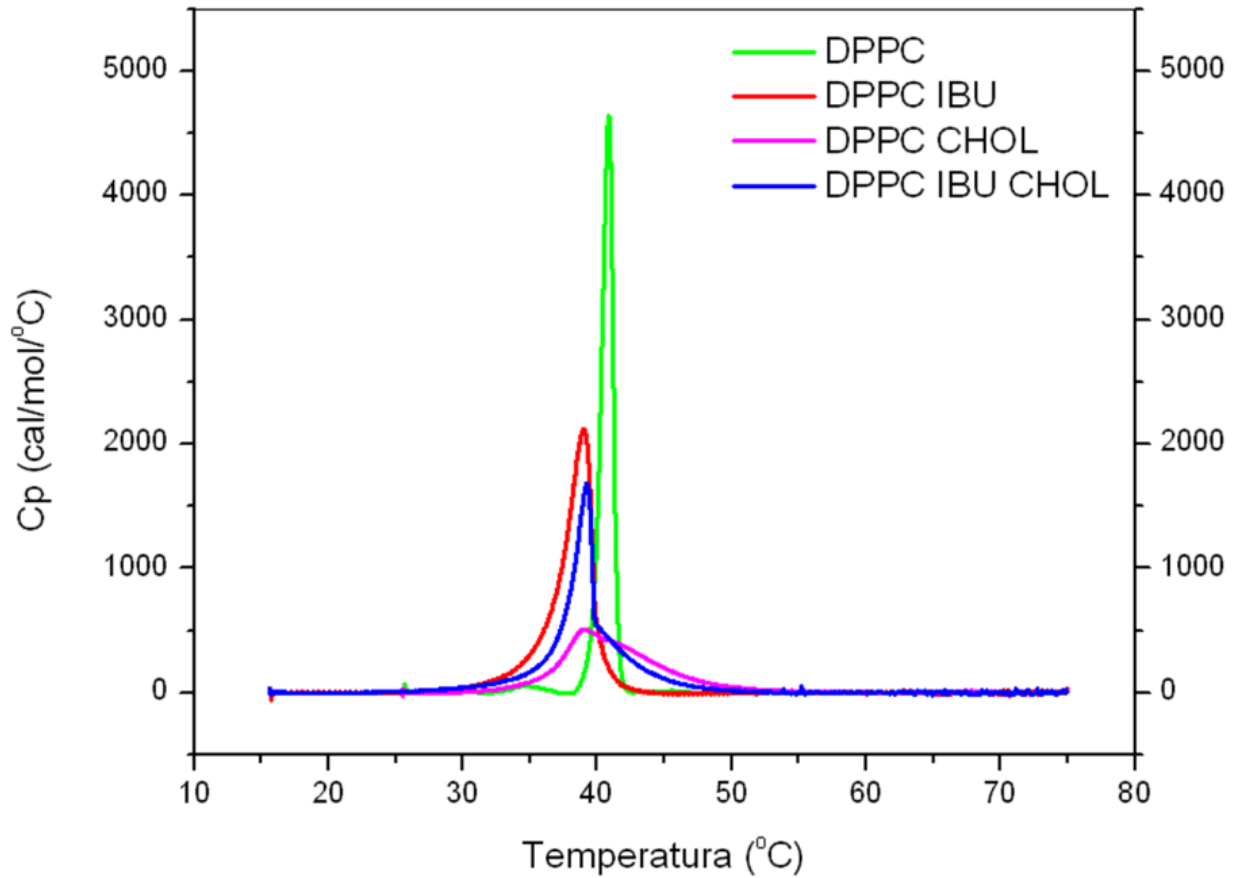


Fig. 4.9c. Se muestra el efecto neto sobre la transición de fase $P\beta \rightarrow L\alpha$.

En general todos los componentes abaten la T_m e incrementan el ancho de la transición (aumento del ΔH). Se aprecia el dominio de CHOL claramente en el sistema DPPC: CHOL, sobre la membrana una vez que se forma en la fase $L\alpha$, efecto que no es tan pronunciado en el sistema DPPC: CHOL: IBU ya que posee menos CHOL. En el sistema que sólo posee IBU, no se aprecia la formación de dominio alguno.

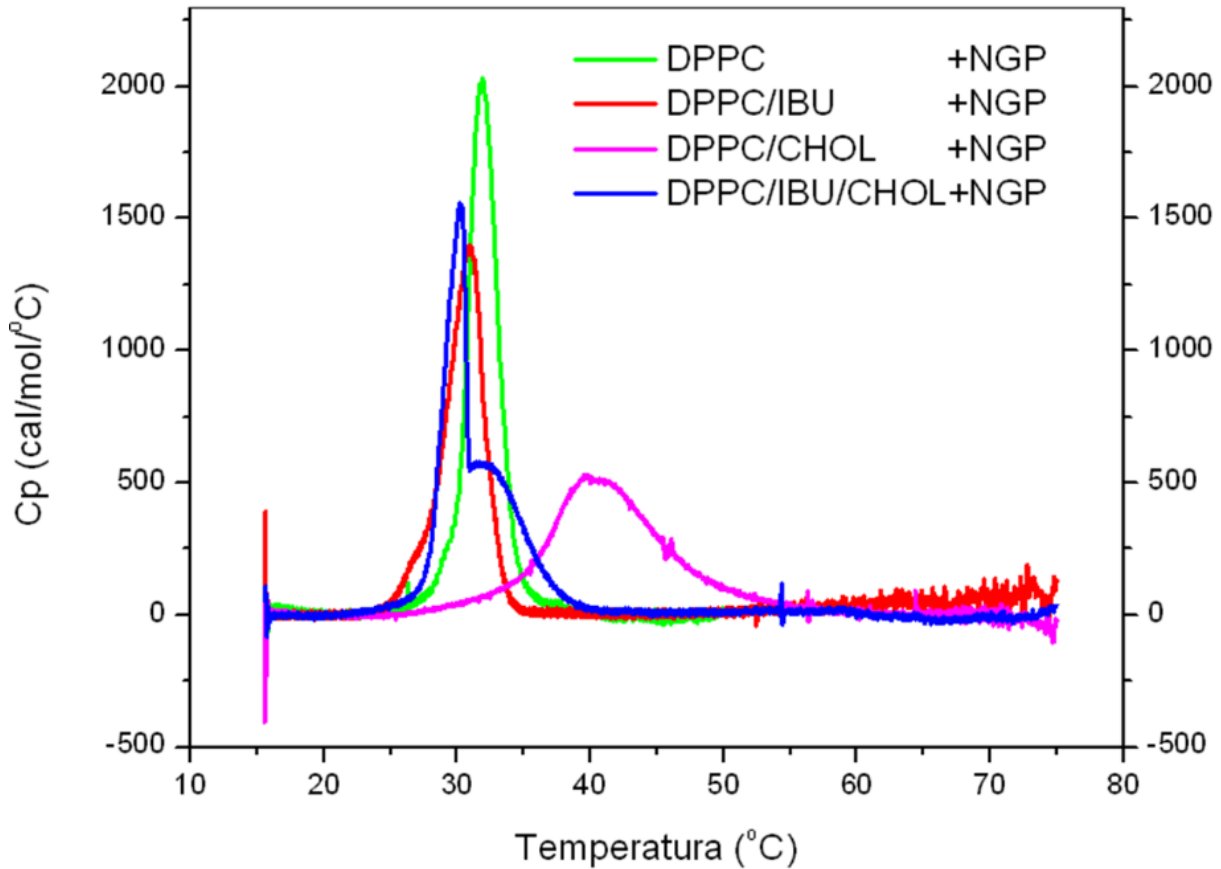


Fig. 4.9d. Se muestra el efecto neto sobre la transición de fase $P\beta \rightarrow L\alpha$.

En general todos los componentes abaten la T_m , a excepción del sistema DPPC: CHOL + NGP, esto se debe a que el NGP tiene afinidad a los dominios de CHOL una vez que éstos se forman en la fase $L\alpha$. Por otra parte todos los componentes siguen incrementando el ancho de la transición (incrementan el ΔH). Se hace presente el dominio de CHOL en el sistema DPPC: CHOL: IBU al incorporarle NGP, lo que demuestra una alta afinidad del NGP sobre el dominio de CHOL, ya que se hace notar el hombro en la fase $L\alpha$ para este sistema.

PARAMETROS DE PARTICIÓN K, ΔG° , ΔH° , ΔS°

La dimensión del coeficiente de partición a primera vista puede causar confusión "M-1", sin embargo el argumento general es que las unidades de concentración no son importantes en la derivación de los coeficientes de partición, porque este parámetro se calcula como cociente de las concentraciones de soluto en dos fases y las unidades de concentración se cancelan. Sin embargo, los valores numéricos de los coeficientes de partición van a diferir considerablemente si se obtienen modificando la concentración del fosfolípido (Ref. 4), de allí que la concentración del fosfolípido en la jeringa, así como la del tensoactivo en la celda se mantienen constante para los experimentos de ITC, donde lo único que varía es la incorporación de IBU, CHOL o IBU+CHO, para observar su efecto en el coeficiente de reparto fig. 4.9d y fig.4.9e.

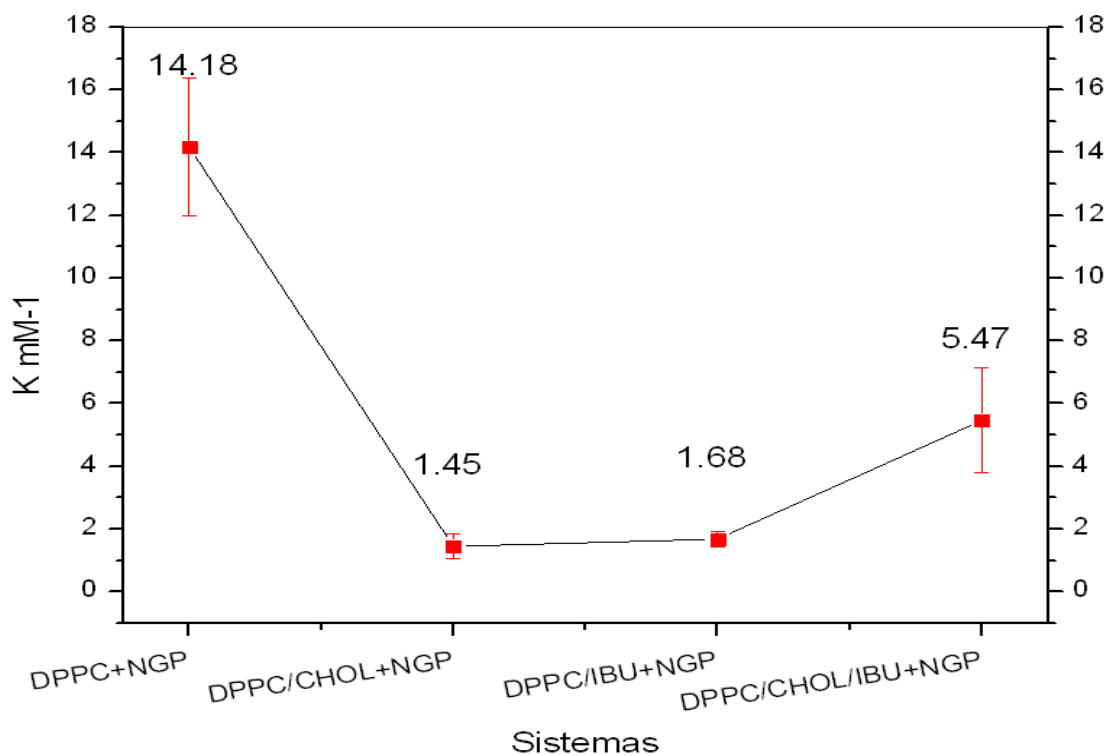


Fig. 4.9e. Constantes de partición K para los sistemas DPPC, DPPC:CHOL, DPPC:IBU y DPPC:CHOL:IBU.

Una solución de cada sistema fue añadida a una solución acuosa 4mM de NGP en un calorímetro TAM. Se colocaron 2ml de una solución acuosa 4mM de NGP en la celda y se hicieron 30 adiciones de 25 μ l de dicho sistema a 298.15K. El calor

involucrado en este proceso fue monitoreado y posteriormente analizado con la finalidad de determinar la constante de partición.

De la fig. 4.9e, se observa que para el sistema menos estable "DPPC", K de partición es más grande (14.18 m^{-1}), ya que no compite con ningún componente extra en la membrana por la asociación con los fosfolípidos. Los sistemas con IBU o CHOL (1.68 y 1.45 mM^{-1} respectivamente), mostraron una K muy similar, eso quiere decir que ambos le confieren una estabilidad a la membrana, en tanto que el sistema que contiene IBU+CHOL le confiere un efecto sinérgico de estabilidad en presencia de NGP (si bien el NGP penetra más en el sistema DPPC, que termina por destruirlo). A continuación se muestra el aspecto físico de los sistemas después de la titulación con de NGP fig. 4.9f.

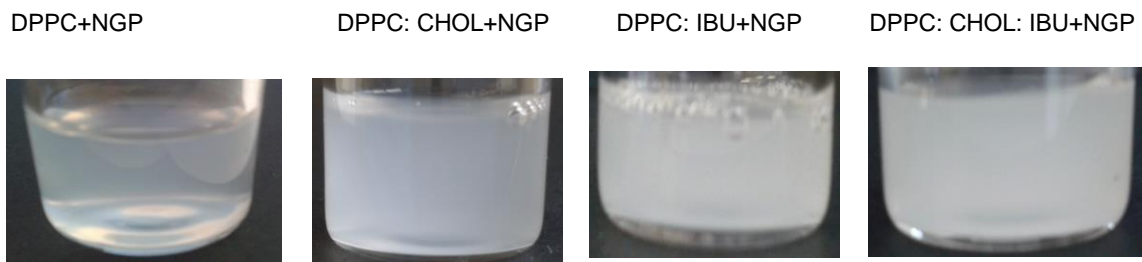


Fig. 4.9f. Aspecto físico de las vesículas mixtas formadas.

¿Cómo saber si la interacción de la inserción del NGP en la membrana es fuerte?

Cuando el ΔG es grande y negativo, esto implica que:

ΔH° debe ser grande y negativo (las interacciones son fuertes)

ΔS° debe ser grande y positivo (gana más entropía)

En la fig. 4.9g. los parámetros termodinámicos muestran en todos los casos que los procesos están dirigidos por la entropía y no por la entalpía. En todos los casos los procesos de partición son espontáneos.

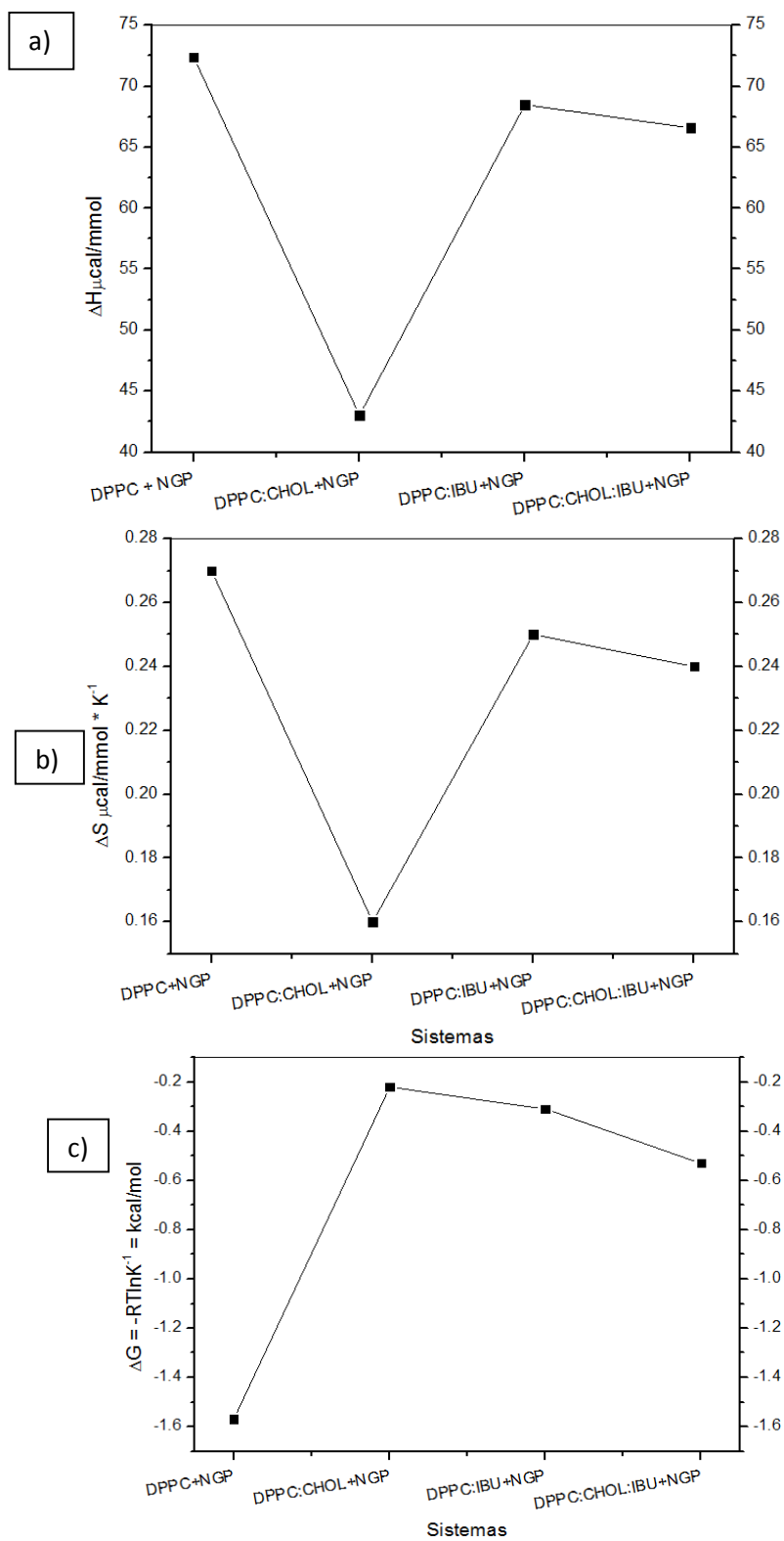


Fig.4.9g. Parámetros termodinámicos del proceso de partición: a) ΔH° , b) ΔS° y c) energía libre de Gibbs ΔG° .

4.10 Conclusiones

Se identificaron las transiciones de fase $P\beta \rightarrow L\alpha$ en los sistemas estudiados, así como los parámetros termodinámicos, obtenidos mediante DSC, antes y después de la titulación con NGP.

Se comprobó la inclusión de las moléculas (IBU, CHOL y el NGP) en los liposomas a través de las transformaciones observadas de los liposomas (ruptura y formación de micelas mixtas y vesículas mixtas) que fueron estudiadas mediante ITC y los resultados fueron analizados utilizando el modelo de tres estados de Lichtenber. Por los resultados obtenidos se concluye que los sistemas que tienen mayor estabilidad son aquéllos que tienen incorporado el CHOL en la membrana en combinación con el NGP.

El D_h disminuye debido a la adición de estos componentes, lo cual es adecuado en una formulación farmacéutica, ya que a menor tamaño se reducen las respuestas inmunes (en caso de usarlo en una vía intravenosa).

El fenómeno de partición en general es espontáneo y está dirigido más por la entropía que por la entalpía.

Se justifica la incorporación de NGP en la formulación, ya que si este sistema se destina a una forma farmacéutica inyectable, se evita el metabolismo de primer paso y se mejora la biodisponibilidad.

4.11 Referencias

- 1) Liposomes a practical approach. Vladimir P. Torchilin, Volkmar Weissig. Second Edition. Oxford university press. 2003. Pg 347-348.
- 2) Biochimica et Biophysica Acta 1798 (2010) 703–718. Surface topography of membranedomains Marie-Cécile Giocondi
- 3) JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY INTERFASE. Liposomes in tissueengineering and regenerative medicine.
- 4) Interaction of detergentswithlipidvesicles JiirgenLasch *
Institutfür Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

5 Abreviaturas

- DPPC: L-alfa-dipalmitoil-Fosfatidilcolina
- NGP: Nonyl- β -glucopyranoside
- IBU: Ibuprofeno
- CHOL: Colesterol
- K: Constante de partici3n
- ITC: Isothermal Titration Calorimetry
- DSC: Differential Scanning Calorimetry
- SEM: Scanning Electron Microscope
- TEM: Transmission Electron Microscopy
- DLS: Dynamic light Scattering
- D_h : Diámetro hidrodinámico
- GI: gastro-intestinal trac
- C_D : Concentraci3n de tensoactivo
- T_s : Sub-transici3n
- T_p : Pre-transici3n
- T_m : Transici3n principal
- $T_{1/2}$: Cooperatividad de transici3n de transici3n principal
- ΔH : Entalpia de una transici3n de fase en DSC, descrita como el área bajo la curva de dicha transici3n
- ΔH^0 : Entalpia molar estándar del proceso de partici3n del tensoactivo en los liposomas obtenido del Modelo termodinámico "relaci3n-molar" de Schutenber