



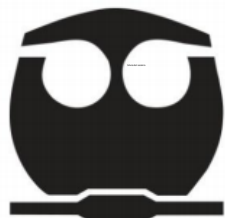
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio fisicoquímico de la nanoencapsulación de
ibuprofeno en vesículas mixtas de Diestearoil
fosfatidilcolina y Octil beta-D-Glucopiranósido

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
ALEJANDRO FELIPE ANASTASIO

ASESOR
SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS



Ciudad Universitaria, Cd.Mx.,2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS
VOCAL: MA. GUADALUPE LEMUS BARAJAS
SECRETARIO: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD
1ER SUPLENTE: CARLOS JUÁREZ OSORNIO
2DO SUPLENTE: LUZ XOCHIQUETZALLI VÁSQUEZ BOCHM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EDIFICIO F, LABORATORIO 301 DE BIO-FISICOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA

DRA. SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS

SUPERVISOR TÉCNICO

DR. CARLOS JUÁREZ OSORNIO

SUSTENTANTE

ALEJANDRO FELIPE ANASTASIO

	Página
INDICE	
Resumen	1
Objetivos	2
Hipótesis	3
Introducción	4
Capítulo I. MATERIALES EMPLEADOS	
1.0. Lípidos generalidades	5
1.0.1. Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC)	6
1.0.2. Colesterol	7
1.1.0. Tensoactivos Generalidades	8
1.1.0.1. Clasificación de los tensoactivos	8
1.1.1. Tensoactivos glucopiranosidos	8
1.1.1.1. n-Octil- β -D-glucopiranosido (OGP)	8
1.1.2. Generalidades sobre micelas	10
1.2.0. Generalidades sobre Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	11
1.2.1. Ibuprofeno	11
1.3.0. Propiedades termodinámicas	12
1.3.1. Potenciales termodinámicos	12
1.3.1.1. Energía de Gibbs	12
1.3.1.2. Entalpía	13
1.3.1.3. Entropía	14
Capítulo II. LIPOSOMAS	
2.0. Generalidades sobre liposomas	15
2.1. Clasificación de liposomas	15
2.1.1. Clasificación Estructural	15
2.1.1.1. Vesículas unilamelares	15
2.1.1.2. Vesículas Oligolamelares	16
2.1.1.3. Vesículas multilamelares	17
2.1.2. Clasificación según su composición y aplicación	17
2.1.2.1. Liposomas convencionales	17
2.1.2.2. Liposomas catiónicos	17
2.1.2.3. Liposomas estabilizados estéricamente	17
2.1.2.4. Inmunoliposomas	17
2.2. Principales componentes estructurales de los liposomas	18
2.3. Métodos de elaboración	19
2.3.1. Método generale	19
2.3.2. Métodos específicos	20

2.0. Extrusión	20
2.5. Mecanismo formación de vesículas mixtas	21
2.6. Análisis termodinámico	23
2.7. Modelo termodinámico	25

Capítulo III. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS

3.0. Dispersión dinámica de luz (DLS)	27
3.1. Potencial Z	31
3.2. Técnicas calorimétricas	36
3.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	36
3.2.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	38

Capítulo IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.0. Formación de película	40
4.1. Dispersión dinámica de luz	41
4.2. Potencial Z	42
4.3. Calorimetría diferencial de barrido	42
4.4. Calorimetría de titulación isotérmica	43

Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.0. Dispersión dinámica de luz (DLS), potencial Z y microscopía electrónica (SEM y TEM)	44
5.1.1 Sistema DSPC y DSPC-OGP	44
5.1.1.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z	44
5.1.1.2. Microscopía electrónica SEM y TEM	46
5.1.2. Sistema DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP	47
5.1.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z	47
5.1.2.2. Microscopía electrónica SEM y TEM	48
5.1.3. Sistema DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP	50
5.1.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z	51
5.1.3.2. Microscopía electrónica SEM y TEM	52
5.1.4. Sistema DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP	53
5.1.4.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z	54
5.1.4.2. Microscopía electrónica SEM y TEM	55
5.1.4.3. Resumen del estudio tamaño de partícula de los sistemas liposomales	56
5.2. Calorimetría diferencial de barrido DSC	58
5.2.1. Sistema DSPC y DSPC-OGP	58
5.2.2. Sistema DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP	60
5.2.3. Sistema DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP	64

5.2.4. Sistema DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP	67
5.2.4.3. Resumen de resultados del estudio por calorimetría diferencial de barrido de los sistemas liposomales	73
5.3 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	
5.3.1. Resultados ITC	77
5.2 CONCLUSIÓN	82
Referencias	83

Tabla de abreviaciones

DSPC	Diestearoil fosfatidilcolina.
DSPC-OGP	Diestearoil fosfatidilcolina- Octil- β -D-glucopiranosido
DSPC-CHOL	Diestearoil fosfatidilcolina -Colesterol
DSPC-CHOL-OGP	Diestearoil fosfatidilcolina -Colesterol- Octil- β -D-glucopiranosido
DSPC-IBU	Diestearoil fosfatidilcolina-Ibuprofeno
DSPC-IBU-OGP	Diestearoil fosfatidilcolina-Ibuprofeno- Octil- β -D-glucopiranosido
DSPC-IBU-CHOL	Diestearoil fosfatidilcolina-Ibuprofeno-Colesterol
DSPC-IBU-CHOL-OGP	Diestearoil fosfatidilcolina-Ibuprofeno-Colesterol- Octil- β -D-glucopiranosido
DOPC	Dioleil fosfatidilcolina
DOPG	Dioleil fosfatidilcolina
DOPE	Dioleil fosfatidiletanolamina
SLF	Sistema de Liberación de Fármacos.
ITC	Calorimetría Diferencial de Barrido
OGP	Octil- β -D-glucopiranosido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido.
PCs	Fosfatidilcolinas
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
SM	Esfingomielina
PS	Fosfatidilserina
PI	Fosfatidilinositol
LUV	Vesículas unilamelares Grandes
HLB	Balance Hidrofílico-Lipofílico
AINEs	Analgésicos no esteroideos
SUV	Vesículas Unilamelares Pequeñas
MUV	Vesículas unilamelares medianas
OLV	Vesículas Oligolamelares
MLV	Vesículas multilamelares
PEG	Polietilenglicol
PC	Fosfatidilcolina

Resumen

En este trabajo se realizaron estudios fisicoquímicos de liposomas o vesículas mixtas (liposomas con más de un componente) para la encapsulación del fármaco ibuprofeno. El constituyente principal de la formulación de los sistemas liposomales, es el fosfolípido Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) a una concentración de 10 mM, el cual se combinó con colesterol e ibuprofeno para formar los siguientes sistemas liposomales: DSPC, DSPC-IBUPROFENO, DSPC-COLESTEROL y DSPC-COLESTEROL-IBUPROFENO. Posteriormente, a través de la técnica calorimétrica ITC, se incorporó el tensoactivo Octil- β -D-Glucopiranosido (OGP) a una concentración 15 mM, menor a la CMC del tensoactivo, para la formación de los sistemas mixtos, DSPC-OGP, DSPC-IBUPROFENO-OGP, DSPC-COLESTEROL-OGP y DSPC-COLESTEROL-IBUPROFENO-OGP. Por medio de la técnica de calorimetría de titulación isotérmica, ITC, se obtuvo el valor de la constante de partición, K, la entalpía, ΔH , del proceso partición del tensoactivo OGP en la bicapa lipídica, siguiendo el modelo de Lichtemberg o tres etapas. El valor de la constante K y el ΔH sirvieron para la obtención de los parámetros termodinámicos ΔG y $T\Delta S$. Los sistemas liposomales también se estudiaron por la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la obtención de los parámetros T_m , ΔH y ΔS de transición de los sistemas antes y después de la titulación calorimétrica. Adicionalmente, se realizaron estudios de dispersión dinámica de luz, potencial Z y microscopía electrónica SEM y TEM, para estudiar el tiempo de estabilidad, morfología y lamelalidad de los sistemas liposomales.

Objetivo general

- Determinar y analizar las propiedades fisicoquímicas de las vesículas mixtas, formadas a partir de Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), colesterol y Octil- β -D-Glucopiranosido (OGP) para la encapsulación de ibuprofeno por técnicas calorimétricas: calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC), en conjunto con las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la incorporación de colesterol, ibuprofeno y OGP en los parámetros termodinámicos y estabilidad de la membrana del fosfolípido Diestearoil fosfatidilcolina.
- Determinar el efecto de la incorporación de OGP a sistemas liposomales elaborados.
- Determinar los parámetros termodinámicos ΔH , ΔS , $T_{1/2}$ y T_m por calorimetría diferencial de barrido de los sistemas liposomales antes y después de la adición del tensoactivo OGP
- 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 del tensoactivo no iónico OGP.
- Determinar el tamaño de partícula y potencial Z de los sistemas estudiados por técnicas dispersivas de luz.
- Determinar la morfología y lamelalidad de los sistemas liposomales elaborados por medio de las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Hipótesis

La elaboración de sistemas liberación de fármacos como los liposomas (que permiten la encapsulación de fármacos con baja disolución en medio acuoso) se pueden modificar mediante la adición de colesterol y OGP con la finalidad de mejorar la nanoencapsulación de un fármaco hidrofóbico modelo (ibuprofeno). El efecto de la adición de estos compuestos a los liposomas, puede ser estudiado por técnicas calorimétricas, mediante el análisis de los parámetros termodinámicos de la transición de fase gel a fase cristal líquido del fosfolípido DSPC.

Introducción

Una gran variedad de fenómenos, tal como, la partición de moléculas en membranas lipídicas, solubilización de sustancias, de sistemas coloidales, entre otras, se pueden describir en fisicoquímica. En la industria farmacéutica es muy importante conocer las propiedades de las formas farmacéuticas que se comercializan, así como la de los componentes constituyentes. En el caso de la elaboración de liposomas conocer sus propiedades fisicoquímicas permite llevar un control de calidad sobre su manufactura e impulsar a la mejora continua del producto. Por otra parte, en las formas farmacéuticas convencionales presentan limitantes en el proceso de absorción de fármacos, que dependen en gran parte de la preparación farmacéutica y vía de administración, por tal razón existe interés en la elaboración de sistemas de liberación de fármacos (SLF), las cuales son formulaciones o dispositivos que permiten controlar la liberación de fármacos de manera constante o con poca variabilidad, en sitios específicos del cuerpo para que se reduzcan los tiempos de administración y así también reducir efectos no deseados [1]. Diseñar un SLF efectivo requiere el conocimiento del fármaco, la enfermedad y el sitio de acción, para así poder controlar algunas propiedades fisicoquímicas, que influyen en la cinética de depuración plasmática, distribución, metabolismo y la interacción de la célula con el fármaco, para garantizar mayor seguridad y eficacia.

CAPÍTULO I. MATERIALES EMPLEADOS

1.0. Lípidos generalidades

Los lípidos son moléculas con propiedades anfipáticas, que en un extremo de la estructura química presentan una o varias cadenas hidrocarbonadas, en algunos casos formando ciclos, al otro extremo se puede presentar más de un grupo polar o iónico. Los lípidos presentan características similares en cuanto a su baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos.

Los lípidos son muy importantes constituyentes de la membrana celular. Los principales lípidos que constituyen a la membrana son los fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol, en donde los fosfolípidos son los más abundantes.

Los fosfolípidos normalmente están constituidos por dos o más cadenas de ácidos grasos y un grupo fosfato unido a otras moléculas, que pueden ser colina, etanolamina, glicerol o serina y representan aproximadamente el 50% en peso de los lípidos en la membrana celular.

Las fosfatidilcolinas (PCs) son los fosfolípidos más abundantes, componen casi el 50% del contenido total de fosfolípidos en las membranas celulares de mamíferos. Son moléculas anfotéricas con una carga negativa en el grupo fosfato y una carga positiva en el grupo amina [2,3].

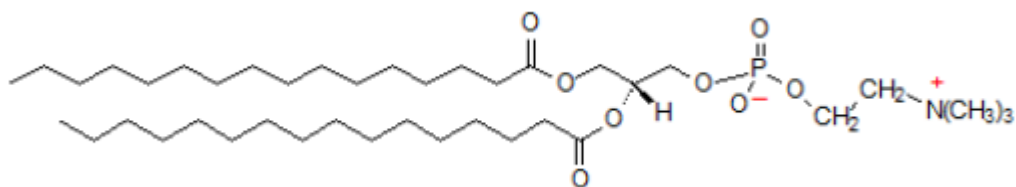


Figura 1.1 Molécula de fosfatidilcolina

La Fosfatidiletanolamina (PE) es el segundo fosfolípido más abundante en la membrana celular de mamíferos, aproximadamente entre el 20 y 30% del contenido total de fosfolípidos, a pH fisiológico se comporta como anfotérico debido al grupo amino protonado y la disociación del grupo fosfato.

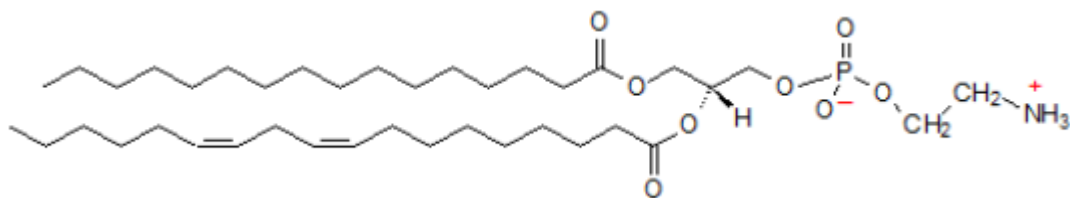


Figura 1.2. Molécula de fosfatidiletanolamina

La Fosfatidilserina (PS) representa cerca de 5 al 10% de fosfolípidos celulares.

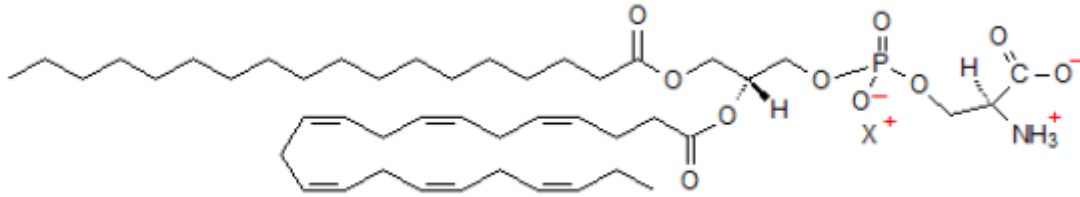


Figura 1.3. Molécula de fosfatidilserina

El Fosfatidilglicerol (PG) es un fosfolípido aniónico a pH fisiológico, se encuentra principalmente en membrana de bacterias. Está presente entre 1-2% en la mayoría de los tejidos animales, pero puede ser el segundo fosfolípido más abundante en el complejo surfactante pulmonar en hasta un 11% del total.

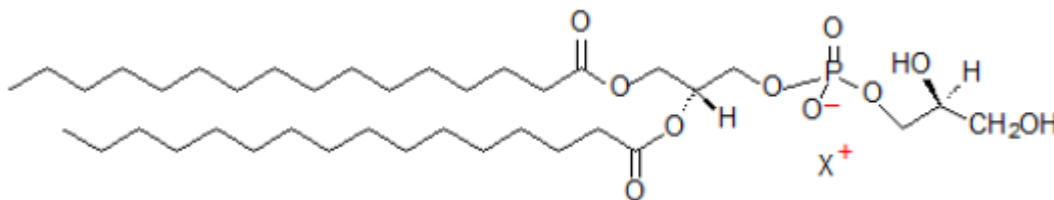


Figura 1.4. Molécula de fosfatidilglicerol

La Esfingomielina (SM). Esfingomielina tiene un grupo de cabeza PC, pero se diferencia de glicerofosfolípidos por estructura base de esfingosina. Representa el 23% del total de fosfolípido de membrana en la membrana de los eritrocitos

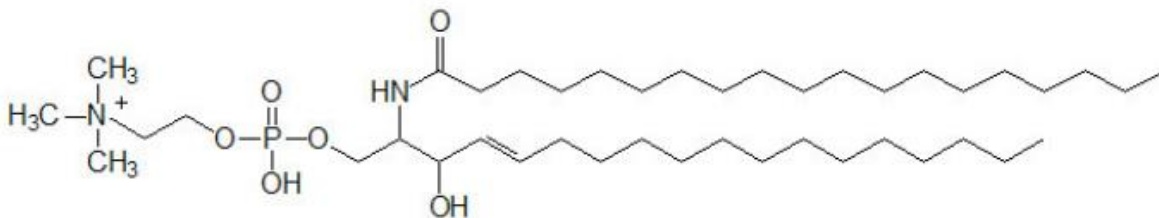


Figura 1.5. Molécula de Esfingomielina

1.0.1. Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC)

Es una molécula lipídica sintética con dos cadenas de acilo de 18 átomos de carbono cada una, en la región polar presenta una carga negativa en el grupo fosfato y una carga positiva en el grupo trimetil de la cabeza de colina. El DSPC es ampliamente utilizada para la manufactura de liposomas.[2,3]

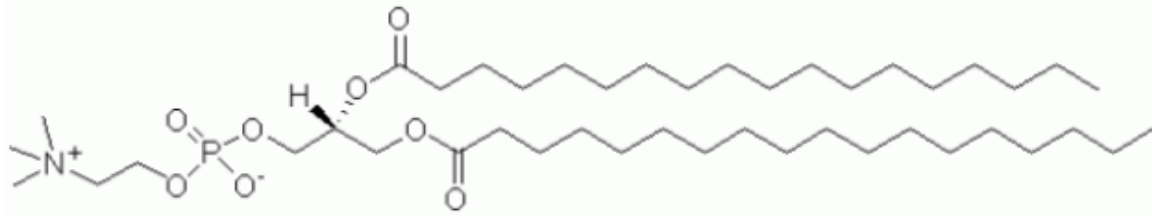


Figura1.6. *Molécula de DSPC*

1.0.2 Colesterol

El Colesterol es un lípido importante constituyente de la membrana biológica aproximadamente 20% en mol en donde se encuentra de manera intercalada, el grupo hidroxilo (OH⁻) del colesterol se orienta hacia la parte acuosa y la fracción hidrofóbica hacia las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. La molécula de colesterol cumple varias funciones diferentes dentro de la membrana celular, una de ellas, es como un modulador de la fluidez de los fosfolípidos tanto en membranas biológicas como en los liposomas. Por otra parte, el colesterol influye en la organización de la bicapa, este hecho está relacionado directamente con la reducción de la permeabilidad de moléculas solubles en agua [2]. En estudios por calorimetría diferencial de barrido (DSC), la incorporación de colesterol en vesículas unilamelares grandes (LUV) produce una ampliación de la transición de fase gel a cristal líquido y disminución eventual de la cooperatividad [4].

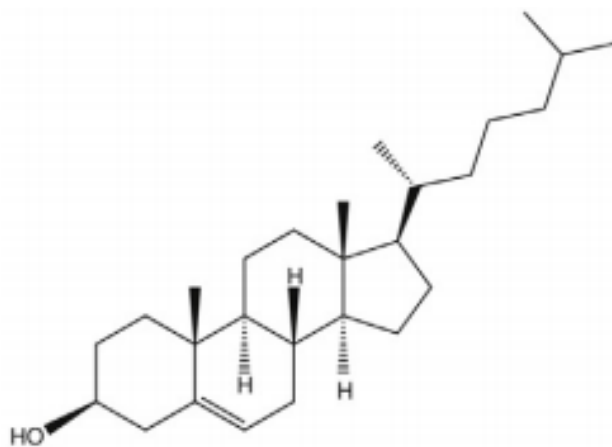


Figura1.7. *Molécula de colesterol*

1.1.0 Tensoactivos generalidades

Los tensoactivos, son sustancias activas que se adsorben en la superficie o interfase y modifican la naturaleza de la tensión superficial, también son conocidos como surfactantes, estas moléculas presentan en la misma estructura química dos regiones, un grupo hidrofílico y un grupo hidrofóbico. Dependiendo de la naturaleza del grupo polar y no polar, el tensoactivo puede adquirir características mayoritariamente hidrofílicas, lipofílicas o una proporción intermedia. La relación entre la porción hidrofílica e hidrofóbica de los tensoactivos, se conoce como Balance Lipofílico-Hidrofílico (HLB) y Griffin en 1949 elaboró una escala de valores arbitrarios, para medir el grado de contribución de cada región de los surfactantes. Los valores de HLB altos implican surfactantes hidrofílicos, mientras valores de HLB bajos implica surfactantes menos polares y más lipofílicos, por medio de este sistema es posible establecer un intervalo de HLB óptimo de eficiencia de los surfactantes, ver figura 1.8.

La actividad superficial de los tensoactivos en la interfase liquido-vapor, varía con la longitud de la cadena hidrocarbonada, si se aumenta longitud, la actividad del tensoactivo se ve aumentada, en cambio cuando se aumenta el carácter hidrofílico, la actividad superficial disminuye [5].

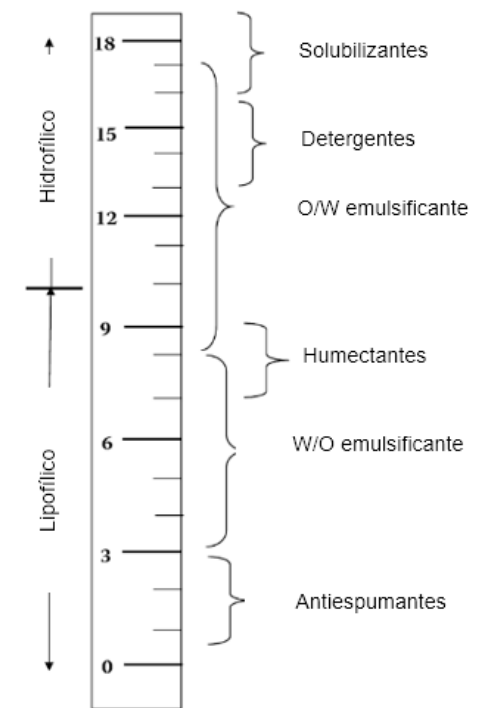


Figura 1.8. Escala HLB y eficiencia de los surfactantes según la contribución de cada grupo polar y apolar

1.1.0.1 Clasificación de los Tensoactivos

Los tensoactivos generalmente se clasifican con base a la naturaleza de la región polar de la molécula de tensoactivo, puede ser aniónica, catiónica y no iónico, pero también existen moléculas con ambas regiones cargadas positiva o negativamente y se pueden comportar como tensoactivos iónicos o catiónicos dependiendo del pH del medio y son conocidos como tensoactivos anfotéricos [5].

1.1.1 Tensoactivos glucopiranosidos

Los glucopiranosidos son tensoactivos no iónicos, en donde la cadena alquílica comprende por lo general de entre 6 y 18 átomos de carbono, las cuales están unidas a un sacárido derivado de la D-glucosa, por medio de un enlace que puede ser tipo éter, éster amino o amido. La región hidrofílica de estos tensoactivos puede comprender más de una unidad de glucosa, por otra parte, cuando el tensoactivo presenta dos o más cadenas alquílicas, estos tensoactivos son conocidos como glucolípidos.

Los glucopiranosidos son solubles en aguas duras, tolerantes a altas concentraciones de electrolito y tienen gran actividad superficial.

Estos tensoactivos tienen la ventaja de ser emulsificantes, son biodegradables e inoocuos para la piel y tienen importancia en el área farmacéutica con respecto a la liberación de fármacos [6,7]

1.1.1.1 Tensoactivo n-Octil-β-D-glucopiranosido (OGP)

El OGP formado por una cadena alquílica de ocho átomos de carbono unido a una molécula de glucosa, tiene una CMC entre 18 y 25 mM, es no tóxico y es ampliamente utilizado por sus propiedades no destructivas [13]. Presenta un valor de HLB de 12.24, calculado, según la ecuación HLB para tensoactivos no iónicos.

$$HLB=20* (Mh /M)$$

Donde

Mh es la masa molar de la región hidrofílica de la molécula de OGP

M es la masa molar de toda la molécula de OGP. [25]

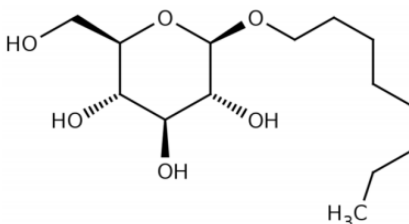


Figura 1.9. Molécula de OGP

1.1.2 Generalidades sobre micelas

Una de las propiedades que presentan los tensoactivos es la formación de agregados o micelas en solución acuosa cuando llegan a una concentración crítica en el medio, esto sucede cuando la superficie del sistema se ha saturado de tensoactivo, entonces en el seno del medio inicia la formación de arreglos moleculares para alcanzar un estado de menor energía. La organización que adquieren las moléculas anfifílicas depende de su polaridad y la geometría, por ello se pueden formar micelas con la región hidrofílica expuesta al medio y la parte hidrofóbica orientada hacia el interior, así también micelas inversas, donde la región hidrofóbica se expone hacia el medio y la región polar hacia el interior del agregado [6].

Como se mencionó anteriormente, la geometría del tensoactivo determina la estructura de los agregados micelares, por tal razón las micelas pueden ser hexagonales, cúbicas, cilíndricas, lamelares y esféricas [6].

La utilidad de la formación de micelas es que pueden ayudar a solubilizar fármacos insolubles o con baja solubilidad en el medio de dispersión disminuyendo el ángulo de contacto, lo cual permite al solvente una mejor humectación y penetración [5].

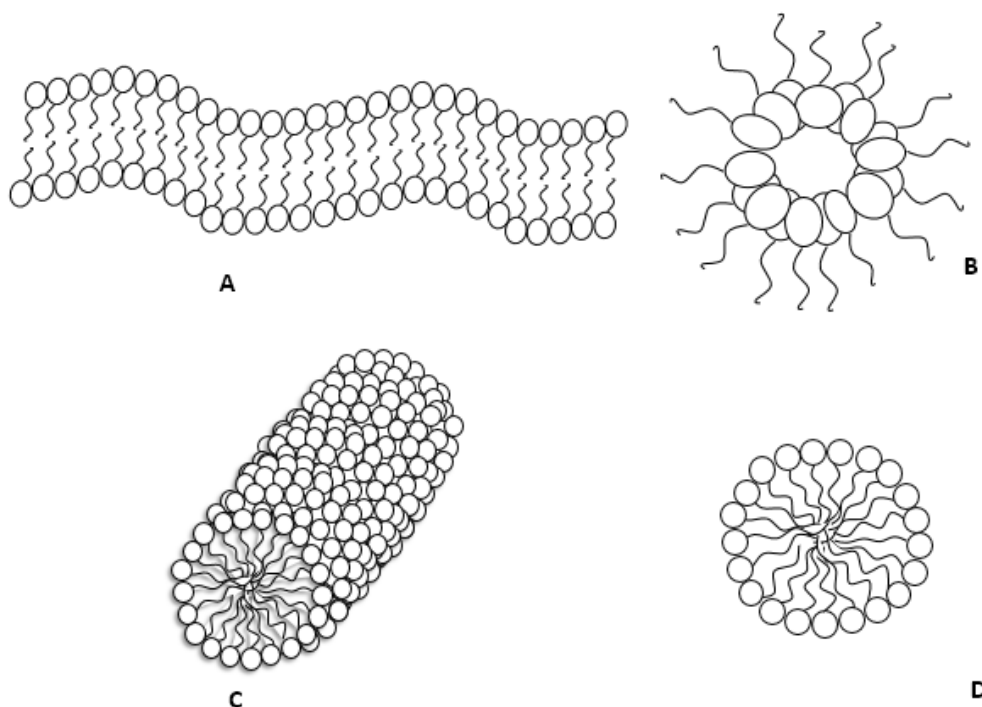


Figura 1.10. Estructuras que pueden adquirir los monómeros de tensoactivos en solución acuosa cuando alcanzan la concentración micelar crítica (CMC). A) lamelares B) micelas inversas C) micelas cilíndricas y D) micelas.

1.2.0 Generalidades sobre Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Los fármacos analgésicos disminuyen la percepción de la sensación dolorosa sin provoca perdida de la conciencia ni alterar la actividad refleja.

Los fármacos analgésicos no esteroideos (AINEs) poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Los AINES actúan inhibiendo la actividad de la enzima prostaglandina H sintasa (ciclooxigenasa), causando la interdicción de la síntesis de prostaglandinas. Existen dos formas estructurales de la enzima ciclooxigenasa, las cuales son COX-1 y COX-2, en donde la enzima COX-1 está presente en la mayoría de las células de forma constitutiva y genera prostanoides que actúan como reguladores de la homeostasis, por otra parte, la enzima COX-2 no está presente en la mayoría de los tejidos, normalmente es inducible por estímulos inflamatorios, por tal razón se piensa que está es la más importante para el tratamiento de la inflamación [8,9].

1.2.1 ibuprofeno

El ibuprofeno es ejemplo de fármaco analgésico no esteroideo, es una molécula solida cristalina estable, prácticamente insoluble agua, pero muy soluble en disolventes como etanol, cloroformo, éter y NaOH 1N.

El ibuprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo con usos en tratamientos de reumatismo y artritis. En odontología es frecuentemente utilizada como analgésico [8].

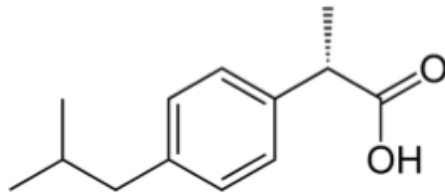


Figura 1.11. *Molécula de ibuprofeno*

1.3.0 Propiedades termodinámicas

1.3.1 Potenciales termodinámicos

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

1.3.1.1 Energía de Gibbs

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

Para que un proceso se realice espontáneamente a una presión constante y una temperatura constante, el cambio en energía libre o energía de Gibbs (**G**) debe ser negativo. La energía de Gibbs es una medida de la energía disponible en el sistema para realizar un trabajo y su valor disminuye durante un proceso espontáneo hasta que alcanza una posición de equilibrio en el que no se puede disponer de más energía, es decir $\Delta G=0$

A partir de la definición de la ecuación de Gibbs (1) y de su diferencial (2) se obtiene la ecuación (5) que es la ecuación que representa el cambio de la energía de Gibbs a temperatura y presión constante.

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

Donde **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:

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

al integrar la ecuación anterior

$$\int_{G1}^{G2} dG = \int_{H1}^{H2} dH - T \int_{S1}^{S2} dS \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

De lo anterior, a temperatura y presión constantes, si:

$\Delta G < 0$ El proceso es espontáneo

$\Delta G = 0$ Sistema en equilibrio termodinámico.

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

ΔH , es un parámetro conocido como el cambio de entalpía en el sistema, es la cantidad de calor absorbido o cedido en un proceso a presión constante.

ΔS , es el cambio en la entropía, es una medida del grado de desorden o aleatoriedad en el sistema.

1.3.1.2 Entalpía

La entalpía se define como:

$$H = U + PV \quad (6)$$

Donde P y V son la presión y el volumen del sistema respectivamente y U es la energía interna.

A partir de la ecuación que representa la primera ley de la termodinámica (7), 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 (13)

$$dU = \delta q - PdV \quad (7)$$

$$\delta q = dU + PdV \quad (8)$$

$$\int_1^2 \delta q = \int_{U_1}^{U_2} dU + P \int_{V_1}^{V_2} dV \quad (9)$$

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

$$q_p = U_2 - U_1 + P(V_2 - V_1) \quad (10)$$

$$q_p = U_2 + P_2 V_2 - (U_1 + P_1 V_1) \quad (11)$$

Sustituyendo la ecuación (6) en la ecuación (11) se obtiene

$$q_p = H_2 - H_1 \quad (12)$$

$$q_p = \Delta H \quad (13)$$

El signo de la variación de la entalpía indica:

$\Delta H < 0$ que el proceso es exotérmico, el sistema cede calor

$\Delta H > 0$ que el proceso es endotérmico, el sistema absorbe calor

1.3.1.3 Entropía

La entropía, es una función de estado que mide la aleatoriedad o número de microestados accesibles del sistema.

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 como: "La entropía del universo aumenta"

$$dS = \frac{\delta q_{rev}}{T} \quad (15)$$

Cuando

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

$\Delta S < 0$ Disminuye el número de microestados [6]

Capítulo II. LIPOSOMAS

2.0 Generalidades sobre liposomas

Los liposomas son estructuras vesiculares esféricas constituidas por una o más bicapas lipídicas que rodean un número igual de compartimientos acuosos, elaboradas principalmente de ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides y algunos surfactantes. Estas estructuras se forman cuando los fosfolípidos son dispersados en un medio acuoso debido a que la energía libre del sistema adopta un valor mínimo. Las cualidades que presentan los liposomas es que posibilitan la encapsulación de fármacos hidrofílicos en compartimientos acuosos o adsorbidos en la superficie debido a una región polar, así como la inserción de fármacos hidrofóbicos en la bicapa lipídica.

Tabla 2.0. Muestra algunas de las ventajas y desventajas del uso de liposomas en formulaciones farmacéuticas.

Ventajas de Liposomas	Desventajas de liposomas
A) Son biocompatibles, biodegradables, no tóxicas y no inmunogénicas.	A) El costo de producción es alto
B) Adecuados para el suministro de fármacos hidrófobos, hidrófilos y anfipáticos.	B) La fuga de fármaco y fusión de los liposomas
C) Protegen al fármaco encapsulado del ambiente externo.	C) Tiempo de vida media corto.
D) Reducen toxicidad, aumentan la actividad terapéutica de los agentes quimioterapéuticos.	D) Termodinámicamente inestables
E) Reducen la exposición de fármaco a los tejidos.	

2.1 Clasificación de liposomas

2.1.1 Clasificación estructural

2.1.1.1 vesículas unilamelares

Vesículas unilamelares pequeñas (SUV): rangos de tamaño de 20 a 40nm.

Vesículas unilamelares medianas (MUV): tamaño oscila desde 40 hasta 80 nm.

Vesículas unilaminares grandes (LUV): rangos de tamaño de 100 nm-1000 nm

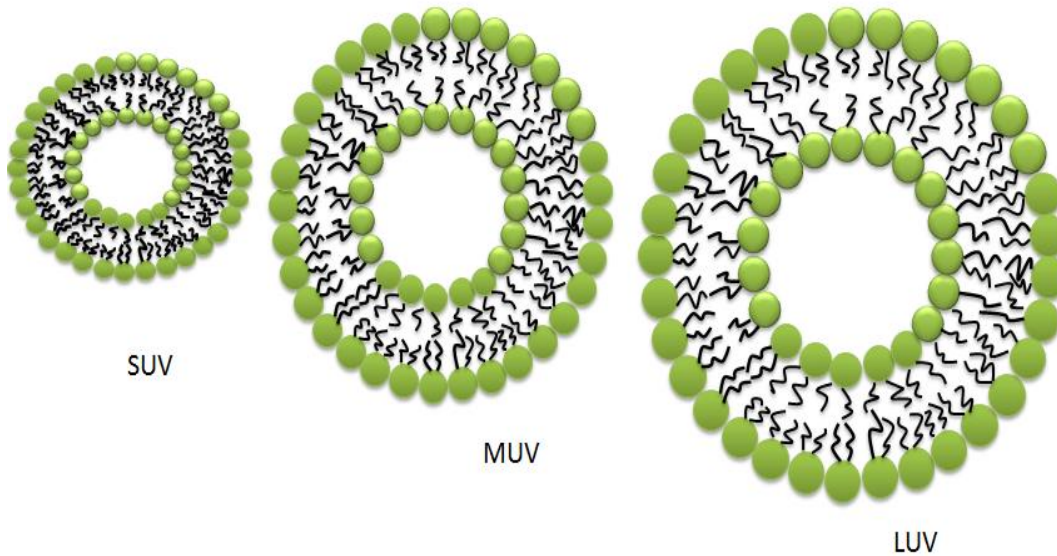


Figura 2.0. Representación de liposomas unilamelares en orden creciente de tamaño SUV, MUV y LUV respectivamente.

2.1.1.2 Vesículas oligolamelares (OLV)

Estas están formadas por 2 a 10 bicapas de lípidos que rodean un gran volumen interno.

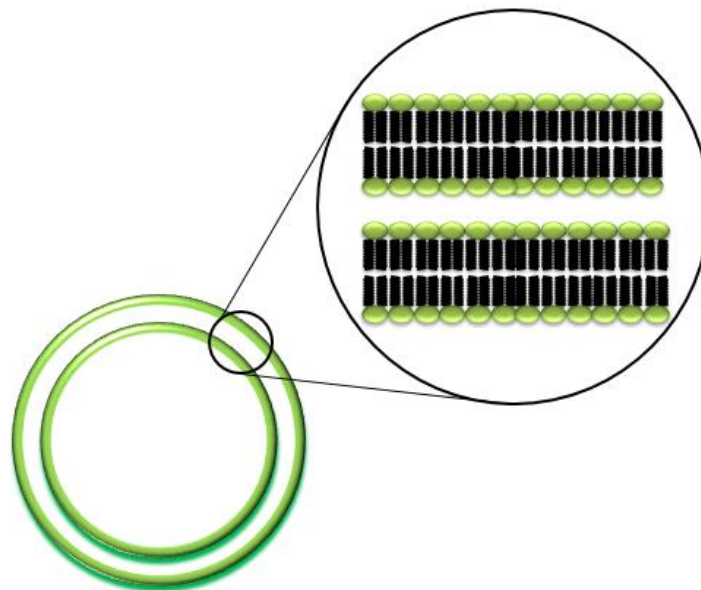


Figura 2.1. Representación de un liposoma oligolamellar, en donde un liposoma se encuentra internamente en un liposoma de mayor tamaño, y cada circunferencia representa una membrana lipídica.

2.1.1.3 Vesículas multilamelares (MLV)

Tienen varias bicapas lipídicas. Pueden distribuir en diferentes compartimentos el volumen acuoso, según la manera por la cual fueron preparados. Los arreglos pueden ser como capas de cebolla, bicapas esféricas concéntricas de LUV / MLV que encierra un gran número de SUV [2]

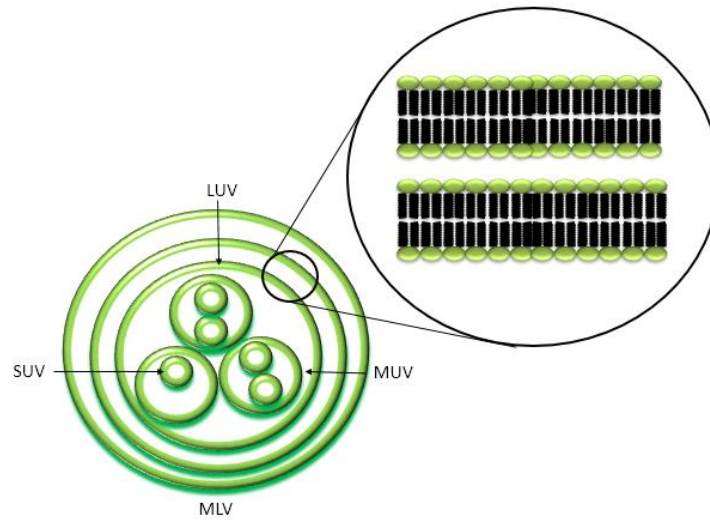


Figura 2.2. Ejemplo liposoma multilaminar donde se ilustra la capacidad que tiene para mantener internamente liposomas de menor tamaño, tal como LUV, MUV y SUV

2.1.2 Clasificación según su composición y aplicación

1. Liposomas catiónicos. Los liposomas catiónicos, están cargados positivamente y son de amplia utilidad para la liberación de ácidos nucleicos ya que la carga positiva de los liposomas interactúa con la carga negativa del grupo fosfato de DNA o RNA
2. Convencionales. Son liposomas cargados negativamente o neutros compuestos únicamente de lípidos, glicolípidos y colesterol, para aumentar el tiempo de circulación.
3. Liposomas estabilizados estéricamente. Son liposomas en los que se incluye polietilenglicol (PEG) en la formulación para evitar que sean reconocidos fácilmente como cuerpos extraños por el sistema inmune, lo cual favorece un aumento en el tiempo de circulación.
4. Inmunoliposomas. Estos liposomas presentan sustancias biológicas unidas en su superficie, tal como anticuerpos monoclonales, vitaminas o algún otro antígeno que funcionan como ligandos que permiten una unión específica en el sitio de liberación del fármaco [5,10].

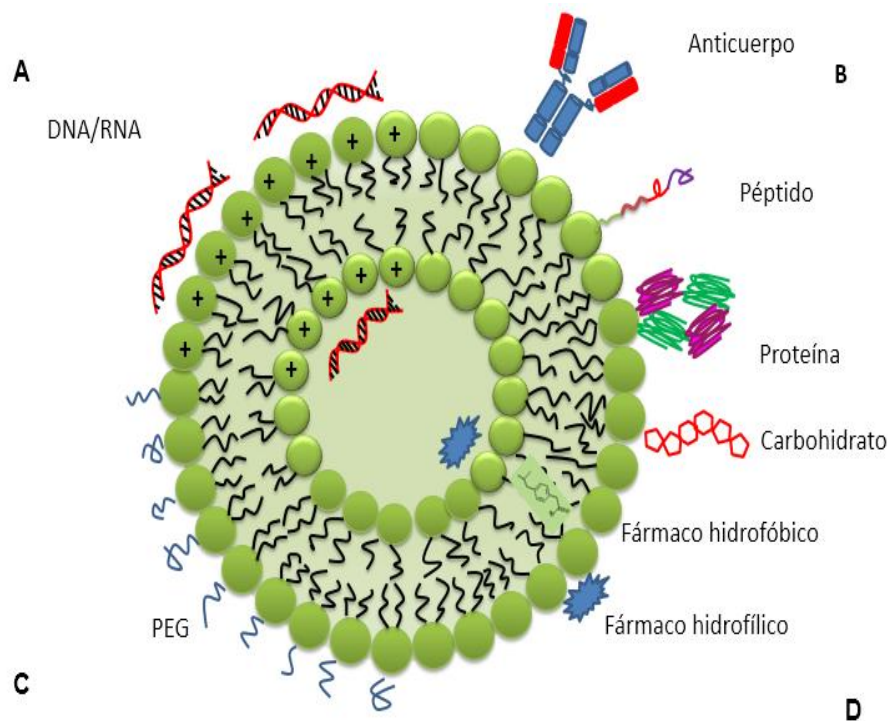


Figura 2.3. Representación de un liposoma que muestra cuatro formas principales. En la fracción (A) se representan a un liposoma catiónico, capaz de interactuar con el material genético, en (B) tenemos a un inmunoliposoma o liposoma que se puede conjugar con diferentes sustratos; en (C) liposomas recubiertos con PEG, y en (D) a los liposomas convencionales capaz de atrapar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.

2.2 Principales componentes estructurales de los liposomas

A) Fosfolípidos: Más utilizados en formulación de liposomas, por ejemplo: fosfatidil colina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidil glicerol (PG), ya que representan el 50% en masa de los lípidos en las membranas biológicas

B) Esfingolípidos: Son los componentes más importantes de células vegetales y animales, su esqueleto es la esfingosina,

C) Esteroles: Principalmente el colesterol y sus derivados son utilizados para la formulación de liposomas ya que tienen la aplicación de disminuir la fluidez de la membrana, reduce la permeabilidad a moléculas solubles en agua y genera estabilidad de la membrana ante fluidos biológicos tal como el plasma.

D) Fosfolípidos sintéticos saturados, por ejemplo: Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil Fosfatidil serina (DDPS),

Fosfolípidos sintéticos insaturados, por ejemplo: Dioleil fosfatidilcolina (DOPC), Dioleil Fosfatidil glicerol (DOPG)

E) Materiales poliméricos: Polientilenglicol (PEG), oxido de polietileno, alcohol polivinílico, metacrilatos, etc.

F) Lípidos Catiónicos: Dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE)

G) Tensoactivos [2,3]

2.3 Métodos de elaboración

2.3.1 Método general

Los lípidos se disuelven en un disolvente orgánico. El disolvente se evapora dejando una pequeña película de lípidos en la pared del recipiente, posteriormente, cuando el fármaco a encapsular es hidrofílico éste se añade en una solución acuosa o modificadora de pH. Para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos, éstos se pueden disolver conjuntamente con los lípidos en el disolvente orgánico con la posterior evaporación del disolvente, seguido de la hidratación a una temperatura superior a la temperatura de transición de los lípidos utilizados. Para la formación de los liposomas se procede a agitación mecánica o sonicación y finalmente el proceso de extrusión según el tipo de liposoma que se desee. Finalmente, el fármaco no encapsulado puede eliminarse por procesos de cromatografía o diálisis.

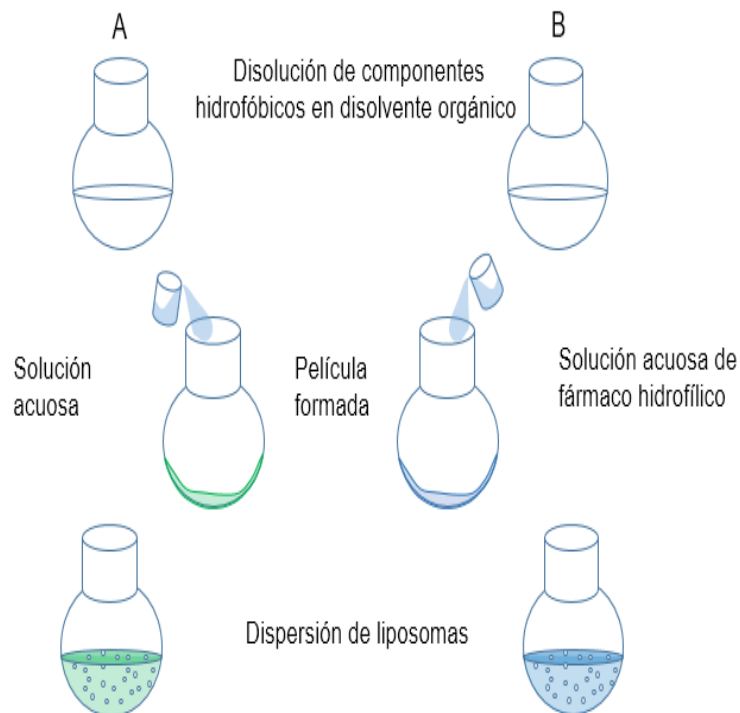


Figura 2.4. *Métodos generales de elaboración de liposomas, en (A) el fármaco hidrofóbico se disuelve en el disolvente orgánico, mientras que en (B) el fármaco hidrofílico se agrega durante la hidratación.*

2.3.2 Métodos específicos.

1. Método de dispersión físicos. En estos métodos el volumen acuoso encapsulado en las membranas lipídicas se encuentra entre el 5 a 10% con respecto al volumen total de la preparación, donde se forman MLVs y se requiere tratamiento adicional para la preparación de vesículas unilamelares.
2. Métodos de dispersión en disolvente. En este tipo de métodos, los lípidos se disuelven primero en un disolvente orgánico y luego se ponen en contacto con la fase acuosa que contiene los materiales a encapsular dentro del liposoma. Los lípidos se alinean en una monocapa en la interfase entre la fase orgánica y acuosa para formar la bicapa del liposoma.
3. Métodos de solubilización en detergente. En este método, los fosfolípidos se ponen en contacto con la fase acuosa que contiene tensoactivos. Las moléculas de fosfolípidos se asocian con los tensoactivos y forman micelas mixtas, posteriormente por métodos de diálisis o cromatografía en columna el tensoactivo es extraído de las micelas mixtas y se forman vesículas unilamelares [11].

2.4 Extrusión

El proceso de extrusión es el paso secuencial de los liposomas a través de filtros de un tamaño de poro definido para generar vesículas unilamelares homogéneas. La técnica de extrusión emplea gas nitrógeno a alta presión, generalmente de 100-800 lb / in² (donde 1 lb / in² = 6895 Pa), para forzar el paso de las vesículas multilamelares (MLV) a través de una membrana de policarbonato de tamaño definido, es un proceso aplicable a gran variedad de mezclas liposomales, se realiza en el orden de minutos limitado por la concentración y es más eficiente que la técnica de ultrasonido.

El equipo Extruder, es una unidad de acero inoxidable robusta y fácil de usar, que puede operar a presiones de hasta 800 lb / In² [11].



Figura 2.4. Imagen del equipo Extruder empleado en este trabajo. Las membranas utilizadas fueron de 100 nm y la presión aplicada alrededor de 30 atm.

2.5 Mecanismo De formación de vesículas mixtas

La interacción de detergente con membranas lipídicas se ha descrito en términos del modelo de los tres estados o etapas. El modelo describe tres etapas que ocurren cuando una dispersión de lípidos se encuentra frente a una concentración creciente de detergente.

Etapa I. Partición de detergente en la membrana lipídica: cuando la concentración de detergente es baja, ocurre la incorporación de detergente de la fase acuosa a las vesículas lipídicas alcanzando una fracción crítica de detergente-lípido y que puede ser descrito por un equilibrio de partición.

Etapa II Transición de fase de bicapa a micelas o proceso de saturación: El aumento de la concentración de detergente induce una saturación de la membrana lipídica e inicia su desintegración, en donde coexisten micelas y bicapas mixtas.

Etapa III. A partir de la etapa II, cuando la concentración de detergente se aumenta, ocurre una completa desintegración de las bicapas lipídicas favoreciendo la formación de micelas mixtas.

el modelo de Lichtemberg se enfoca en tres topologías estructurales principales: estructuras lamelares, micelas cilíndricas y micelas mixtas, aunque dada la complejidad de los fenómenos que ocurren, también se han propuesto estructuras como micelas cilíndricas y vesículas abiertas, pero que no se presentan en la siguiente figura [12,13].

Modelo de los 3 estados

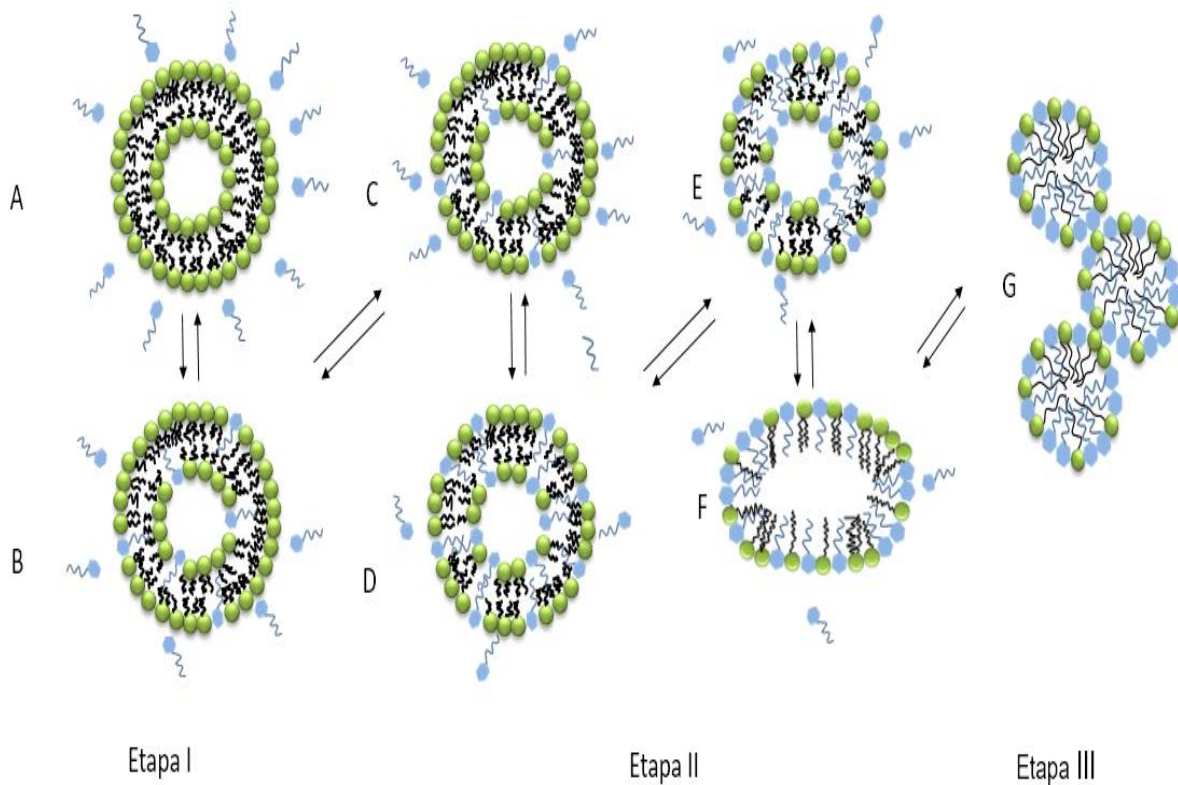


Figura 2.5. La imagen muestra el mecanismo de la formación de vesículas mixtas o modelo de las 3 etapas o estados. En (A), que corresponde a la etapa I, se encuentra el liposoma íntegro y a medida que se agrega tensoactivo, éste se incorpora en la bicapa (B). En la etapa II indicado en los incisos de (C) a (E) debido a un aumento de la concentración de monómeros de tensoactivo, éstos se integran en la membrana al grado de saturarla e inducir la formación de estructuras micelares (F). A medida que la concentración de monómeros de tensoactivo aumenta, se favorece la formación de las estructuras micelares de menor tamaño. En este experimento se invierte el proceso de etapas en el orden III, II, I.

2.6 Análisis termodinámico

Si un tensoactivo es disuelto en una fase acuosa a una concentración distintivamente por debajo de su concentración micelar crítica ($C_D^0 \ll \text{CMC}$) se repartirá en la membrana sin perturbar la misma. Las propiedades físicas de la membrana cambiarán graduadamente a medida que el detergente se acumule y las propiedades termodinámicas pueden también cambiar con la composición de la membrana [12]

En este experimento las vesículas lipídicas son inyectadas dentro de una solución *monomérica* de OGP, causando la partición de las moléculas de detergente dentro de la bicapa membranal. Si el detergente está a una concentración suficientemente baja ($C_D \ll 15\text{mM}$), la partición de la membrana es el único proceso considerado [12].

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

El calor asociado a la reacción es

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

De donde

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

Los cuales están definidos como [12,14]

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

$\delta H_i - \delta H_{i-1}$ = 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 detergente unido es:

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

Dado que el calor de reacción acumulado es definido como:

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

Sustituyendo (1) en (4)

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

Sustituyendo (3) en (5)

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

Despejando n_i de (6)

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

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

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

Sustituyendo n_i de (7) en (8)

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

$C_{D,b}$ puede ser evaluada experimentalmente del calor acumulado de reacción si se conoce ΔH_D^0 . [12,13]

2.7 Modelo Termodinámico.

Considerando el equilibrio de partición detergente-membrana, tal que $n_{D,b}$ moles de detergente 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 detergente. 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 detergente insertado en la membrana (unido) al lípido total. La concentración de detergente 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 detergente libre en solución $C_{D,f}$, y la relación molar de detergente insertado en la membrana R_b .

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

La constante K tiene dimensiones de una concentración recíproca. 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:

Sustituyendo en (10)

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

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

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

Tomando en cuenta la conservación de la masa:

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

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

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

Sustituyendo (14) en (12)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Derivando (21)

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

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

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

Igualando (9) y (24)

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

Despejando δh_i de (26)

$$\delta h_i = \frac{K C_D^0 \delta C_L^0}{(1 + K C_L^0)^2} V_{\alpha} \Delta H_D \quad (27)$$

[12,14,15]

La ecuación de ajuste es una ecuación de tipo $f = a x / (1+bx)^2$ [12,16].

Formándose a lo largo de la titulación bicapas mixtas [12,17]

Capítulo III. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS

3.0. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés), conocida también como espectroscopía de correlación de fotones, es una técnica fisicoquímica que mide la velocidad a la que las partículas (en una suspensión o un líquido) difunden debido al movimiento Browniano, y analiza la intensidad de las fluctuaciones de la luz dispersada por la partícula y lo relaciona con el tamaño.

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 como el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico

El tamaño de partícula es determinado por la correlación entre la variación de la intensidad de luz, con el movimiento browniano de las partículas por medio de un procesamiento matemático y se calcula por la ecuación de Stokes-Einstein. El tamaño de partícula se da en términos de radio hidrodinámico, es decir, es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de traslación que la partícula en análisis.

Ecuación de Stokes-Einstein
$$d(H) = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

En donde

$d(H)$ = Diámetro hidrodinámico

K = Es la constante de Boltzmann (1.38×10^{-16} erg K^{-1})

D = Coeficiente de difusión traslacional

η = Viscosidad del medio (1.002×10^{-2} poise en agua a $20^{\circ}C$, 0.890×10^{-2} poise a $25^{\circ}C$)

T = Temperatura absoluta.

Se requiere una temperatura estable, de lo contrario se provocarán movimientos no aleatorios que limitan una correcta interpretación de tamaño, y el conocimiento de la viscosidad del líquido (debido a que la viscosidad de un líquido está relacionada con su temperatura).

El coeficiente de difusión de traslación, D , a la que las partículas están difundiéndose, se mide mediante el registro de la velocidad a la que la intensidad de la luz dispersada fluctúa, en función del tiempo. Las partículas pequeñas presentan mayor movimiento Browniano en el medio, por lo tanto, presentarán mayor fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada en comparación con partículas de mayor tamaño, como se muestra en la siguiente figura.

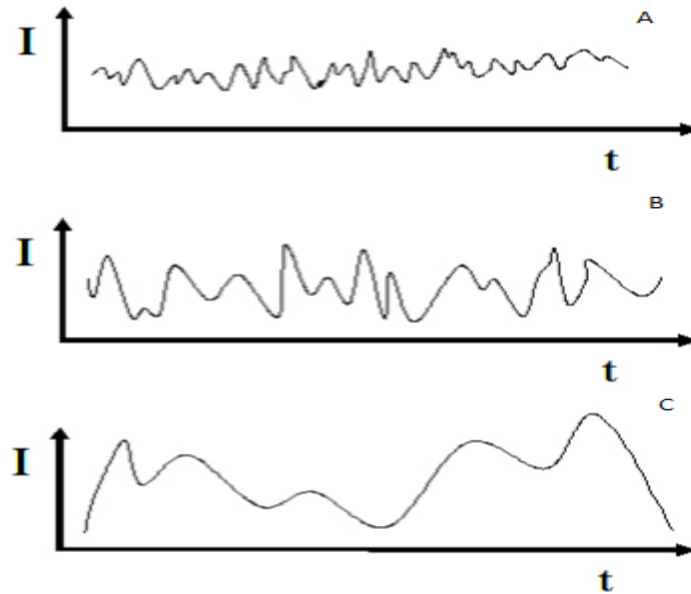


Figura 3.0. En la imagen se muestra la gráfica de Intensidad vs tiempo, donde se observa un aumento en las fluctuaciones de la intensidad de las partículas pequeñas, medianas y grandes en las gráficas A, B y C respectivamente debido a que las partículas pequeñas presentan mayor movimiento Browniano, se deduce que las partículas pequeñas causan fluctuaciones de intensidad más rápidamente que las partículas grandes. [18]

Instrumentación

El análisis se realiza iluminando las partículas en suspensión o en líquido en una celda, con un láser de luz monocromática y analizando la variación de la intensidad de las fluctuaciones de la dispersión de luz. Un detector es usado para medir la intensidad de luz dispersada en un ángulo determinado dependiendo del modelo en particular.

La intensidad de la luz dispersada debe estar en el intervalo 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 para reducir la intensidad del rayo láser y por lo tanto la intensidad de la luz dispersada.

Un correlacionador es el dispositivo en el que la señal de Intensidad de Dispersión que viene del detector, se hace pasar por un tablero de procesamiento de señal digital (compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo consecutivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable). Finalmente, los datos obtenidos son analizados mediante un software y se obtiene el tamaño [12,18].

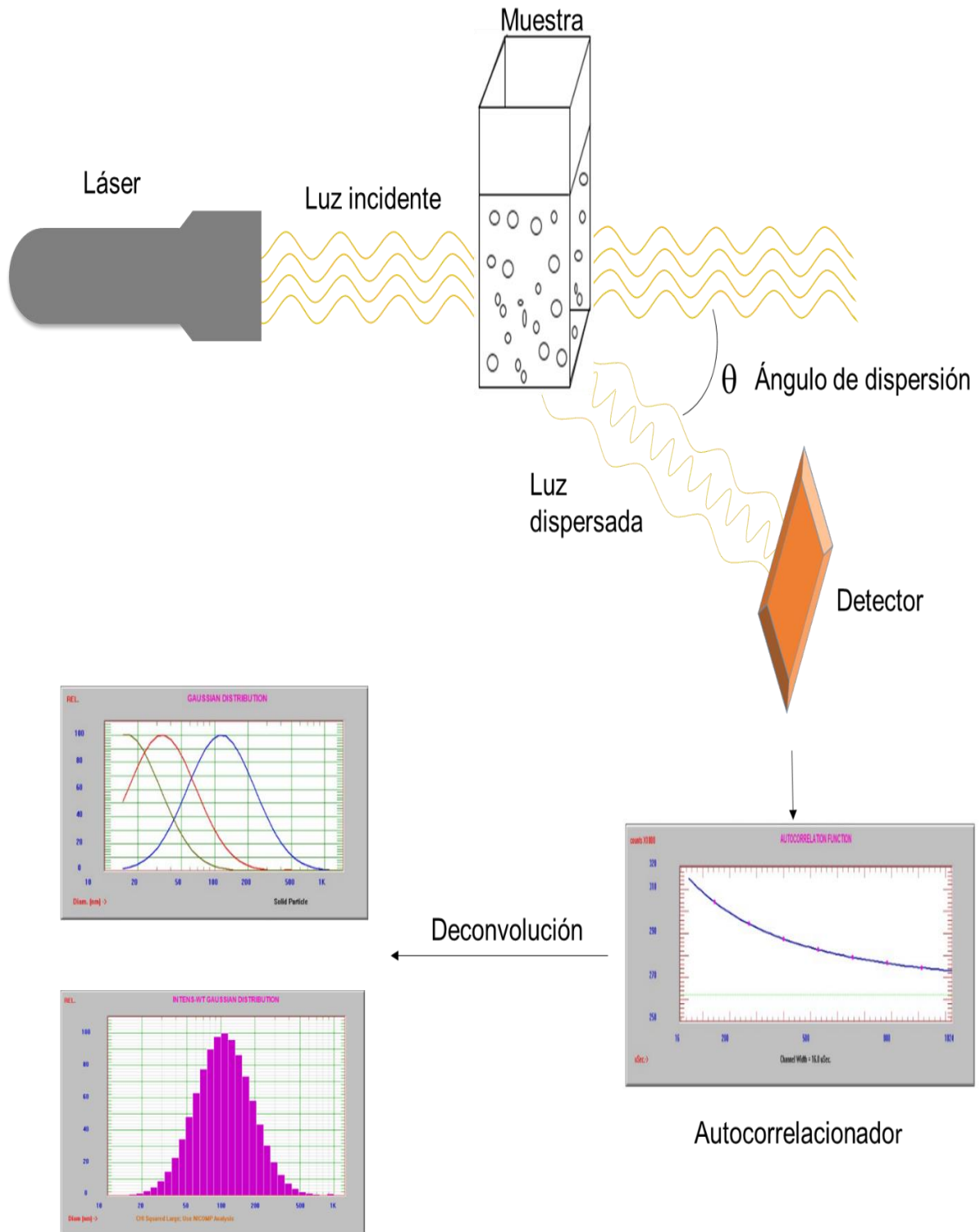


Figura 3.1 Representación esquemática de la instrumentación de un equipo DLS para medición de tamaño de partícula.

3.1 Potencial Z

Los fenómenos de sedimentación de las partículas coloidales, dependen de la presencia de la carga en la superficie de una partícula, que puede ser de naturaleza negativa o positiva, lo cual implica una atracción o repulsión electrostática entre partículas coloidales adyacentes. Un aumento de la carga eléctrica propicia que las partículas adyacentes estén en suspensión un tiempo considerable debido a la repulsión electrostática generada. Por el contrario, si se disminuye la carga; las partículas sedimentan al existir una menor repulsión y por la acción gravitacional. La medición de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas conceptualmente se conoce como potencial Z o potencial electrocinético, y se determina midiendo la velocidad de las partículas cargadas bajo la influencia de una diferencia de potencial.

Para describir la naturaleza del potencial electrostático cerca de la superficie de una partícula, se utilizan modelos como el de la doble capa eléctrica. Si consideramos un coloide negativo en un medio con iones positivos llamados contra-iones, éstos se adsorberán en la superficie del coloide formando una capa rígida llamada capa de Stern. Los contra-iones en el seno de la suspensión son también atraídos por el coloide negativo, pero repelidos por los contra-iones adsorbidos, esta atracción disminuye con la distancia, hasta alcanzar un equilibrio con la presencia de iones negativos, llamados co-iones que tienen la misma carga que el coloide, esto genera una nueva capa llamada capa difusa. La presencia de la capa de Stern y la capa difusa forman la doble capa eléctrica, como se muestra en la figura 3.2.

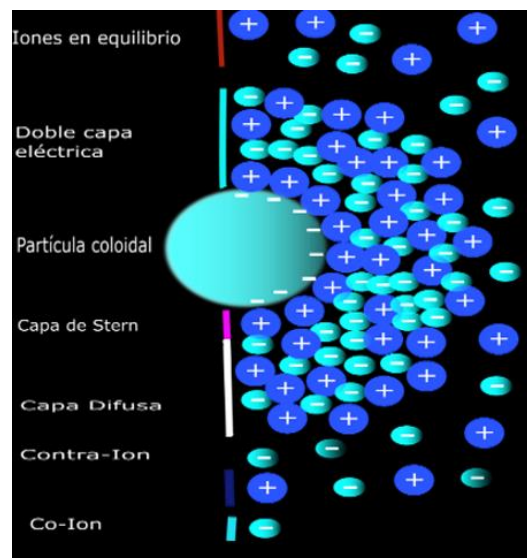


Figura 3.2. Representación de una partícula coloidal con carga negativa en donde se indican las capas superficiales (stern y difusa) debido a presencia de iones positivos y negativos en el medio.

El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución que depende de la concentración y el tipo de iones presentes. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente tiende a cero cuando la distancia aumenta porque las concentraciones de iones positivos y negativos tienden a ser equitativos. Un punto de particular interés es el potencial donde termina la capa de stern y empieza la capa difusa, a este potencial, se le denomina potencial zeta, como se muestra en la figura 3.3.

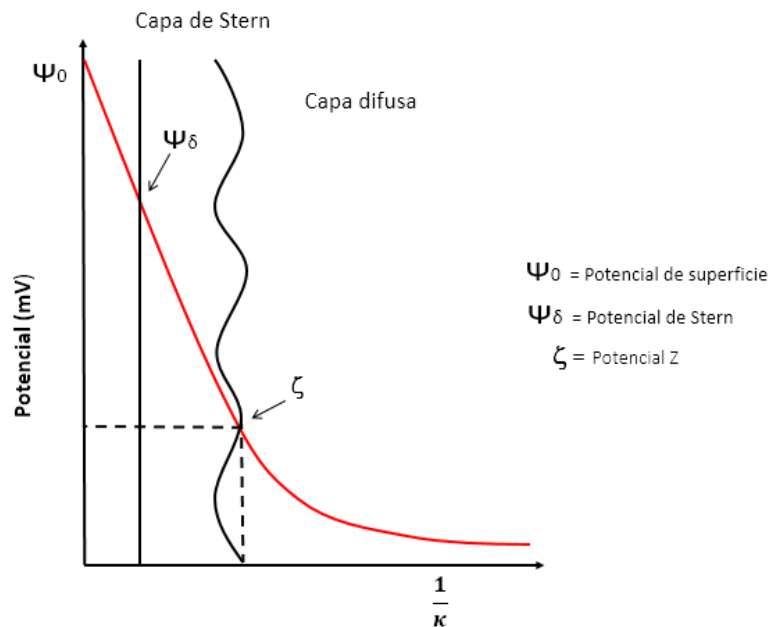


Figura 3.3. Gráfica de potencial en función de la distancia superficial, donde se indica el potencial zeta que se genera entre la capa de stern y la capa difusa [5].

El origen de la carga superficial, depende de la naturaleza de la partícula y el medio circundante, a continuación, se describen dos mecanismos de este fenómeno.

A) La ionización de los grupos de superficie.

La disociación de grupos ácidos en la superficie de una partícula dará lugar a una superficie cargada negativamente. Por el contrario, una superficie básica genera una carga positiva, la magnitud de la carga de la superficie depende de la fuerza de ionización de los grupos ácidos o básicos y el pH de la solución. La carga superficial se puede reducir a cero variando la ionización superficial o modificando el pH del medio.

B) La adsorción de especies cargadas

Si la partícula adsorbe tensoactivos iónicos, es decir, aniónicos y catiónicos, proporcionarán una carga negativa y positiva respectivamente a la partícula, lo mismo pasaría dependiendo de los iones presentes en el medio.

Fundamento análisis potencial Z

El análisis de potencial zeta por dispersión de luz electroforética (ELS, por sus siglas en inglés, Electrophoretic Light Scattering), es la técnica que analiza la dispersión de la luz incidente de partículas en movimiento, cuando se encuentran bajo la influencia de un campo eléctrico. Generalmente ELS está basado en la técnica de dispersión dinámica de luz y son combinados en un mismo equipo.

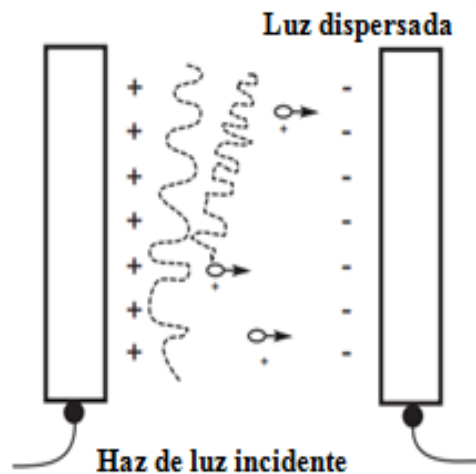


Figura 3.4. Representación de la dispersión de luz incidente en las partículas coloidales en un campo eléctrico.

Para calcular valor del potencial Z por ELS, es necesario obtener la movilidad electroforética, μ , dado que las partículas cargadas alcanzan a tener una velocidad, V , proporcional a la magnitud del campo eléctrico, E , se relacionan con la movilidad electroforética como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\frac{V}{E} = \mu \quad (1)$$

Donde

V = velocidad de la partícula cargada (cm/s)

E = Campo eléctrico (V /cm)

μ = Constante de proporcionalidad o movilidad electroforética ($\text{cm}^2\text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). Debido a que las velocidades de las partículas son tan pequeños, se expresa μ en términos de unidad de movilidad (M.U).

Por otra parte, las partículas en movimiento dispersan la luz incidente a una frecuencia, ν_s , con respecto a la frecuencia incidente, ν_0 conocido como desplazamiento Doppler, ($\Delta\nu = \nu_s - \nu_0$), y depende de la velocidad de la partícula, la longitud de onda del haz de luz incidente y el ángulo de dispersión, y relacionan como se muestra en la siguiente ecuación.

$$2\pi\Delta\nu = K \cdot V \quad (2)$$

Donde

V = velocidad de la partícula

K = es el vector de onda dispersado, que equivale a:

$$K = \left(\frac{4\pi n}{\lambda_0}\right) \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3)$$

En donde

λ_0 = longitud de onda del haz de luz incidente

n = índice de refracción del disolvente

θ = ángulo de detección de la luz dispersada

El valor de $\Delta\nu$, relación entre el haz de luz incidente y la onda de luz dispersada (vector K) obtiene de las ecuaciones 2 y 3, dado que el vector k en la componente en x es:

$$Kx = K \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4)$$

Al sustituir la ecuación (4) en la ecuación (2) se obtiene

$$\Delta\nu = \left(\frac{KV}{2\pi}\right) \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5)$$

Si a la ecuación 5 agregamos el valor del vector de onda dispersado obtenemos la siguiente ecuación

$$\Delta\nu = \left(\frac{2nV}{\lambda_0}\right) \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (6)$$

Utilizando la identidad trigonométrica

$$\text{sen}(2\theta) = 2\text{sen}(\theta)\cos(\theta)$$

La ecuación 6 se reduce a

$$\Delta\nu = \left(\frac{nV}{\lambda_0}\right) \text{sen}(\theta) \quad (7)$$

Finalmente, dado que la dispersión de la luz incidente depende de la velocidad de las partículas cargadas, al despejar V de la ecuación 7

$$V = \left(\frac{\lambda_0}{n \sin(\theta)} \right) \Delta v \quad (8)$$

Recordar que $\mu = \frac{V}{E}$, si se sustituye el valor de V de la ecuación anterior y se despeja μ , se obtiene:

$$\mu = \left(\frac{\lambda_0}{n \sin(\theta)} \right) \left(\frac{1}{E} \right) \Delta v \quad (9)$$

El equipo NICOMP TM 380 ZLS Particle Size/Zeta Potential Analyzer utiliza los siguientes parámetros como constantes:

$$\lambda_0 = 0.6328 \mu\text{m}$$

$$n = 1.33 \text{ del agua}$$

$$\theta = 14.8 \text{ grados}$$

Por lo tanto, la ecuación 7 se reduce a:

$$\mu = 1.867 \left(\frac{1}{E} \right) \Delta v \quad (10)$$

El valor del potencial ζ , se obtiene de la movilidad electroforética, μ , si la concentración de iones móviles en solución es suficientemente alta, entonces se aplica la ecuación.

$$\xi = \frac{\eta \mu}{\epsilon} \quad (11)$$

Donde

μ = es la movilidad electroforética

η = es la viscosidad

ϵ = la constante dieléctrica del agua

Cuando la presencia de iones es baja, se aplica la ecuación [19,20]

$$\xi = \frac{3\eta\mu}{2\epsilon} \quad (12)$$

3.2 Técnicas calorimétricas

Los métodos de análisis térmicos sirven para caracterizar una gran variedad de fenómenos físicos y químicos que pueden ser producidos por el efecto de cambios en la temperatura. Generalmente los métodos térmicos implican el calentamiento de una muestra en condiciones controladas, bajo la observación de los cambios físicos y químicos que ocurren, en estos métodos, se miden diferentes propiedades fisicoquímicas tal como el punto de fusión, la capacidad térmica, los calores de reacción, y los cambios en las propiedades de flujo de materiales bioquímicos. Los métodos más comunes son: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés Differential Scanning Calorimetry), Análisis Térmico Diferencial y Análisis Termomecánico [21].

3.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia frente a un material de referencia, cuando se aumenta o disminuye la temperatura de manera controlada durante el estudio.

Fundamento de la técnica e instrumentación

El equipo DSC está diseñado para mantener a la misma la temperatura la celda de la muestra y la sustancia de referencia, cuando ocurre una transición de fase en la celda de la muestra, se crea una diferencia de temperatura (ΔT), con respecto a la celda de referencia, la diferencia de temperatura es detectada por un sensor de temperatura, una termopila cuya señal eléctrica comanda un sistema de compensación de energía que suministra un exceso de potencia eléctrica a la celda de menor temperatura para compensar la energía absorbida o liberada necesaria para llevar a un ΔT igual a cero.

El gráfico obtenido representa, en el eje de las ordenadas la capacidad térmica y en las abscisas la temperatura, del gráfico se obtienen los parámetros termodinámicos: T_m , ΔH , y $T_{1/2}$ del análisis.

En transiciones de fase de bicapas lipídicas, la T_m es el punto donde la capacidad térmica, C_p , alcanza su valor máximo, y representa la temperatura a la cual ocurre la transición de fase principal, es decir, es la temperatura a la cual ocurre el paso de la fase gel a la fase cristal líquido. La T_m varía con la longitud y número de cadenas y con la presencia de instauraciones en posición *cis* de la cadena hidrocarbonada para un lípido en particular y se modifica con la presencia de un componente externo [3]. El ΔH es la energía involucrada en el proceso del cambio de fase y representa el área bajo pico del termograma. $T_{1/2}$ representa en el termograma la amplitud de la transición de fase a media altura, la cual se relaciona inversamente con la cooperatividad de la transición de fase [12].

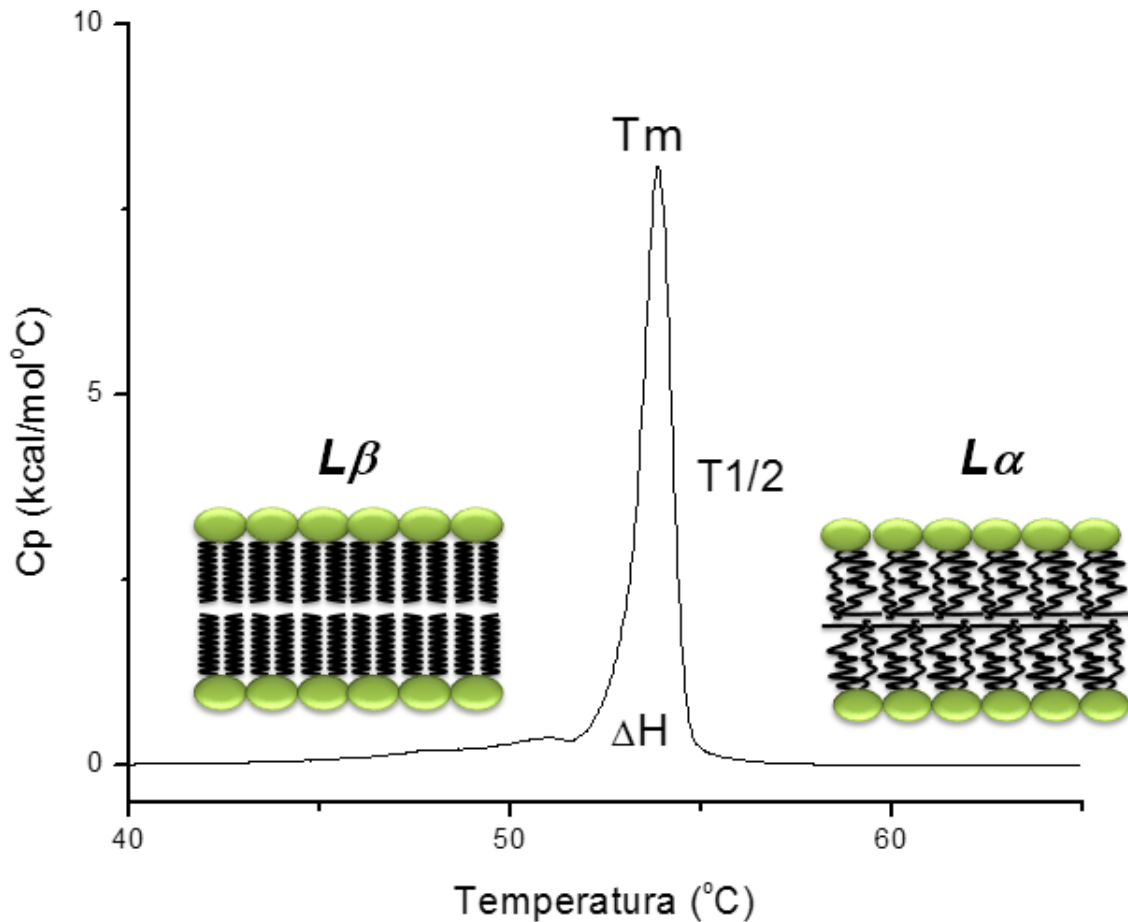


Figura 3.5. Termograma de DSPC (10mM) donde se muestran la fase gel ($L\beta$) y la fase líquido cristalino o fase fluida ($L\alpha$). La T_m corresponde a la temperatura de la transición de fase principal. El área bajo el pico es el valor de la entalpía, ΔH del proceso de transición de fase. La entropía, ΔS , se obtiene de la relación $\Delta S = \Delta H / T_m$.

Los flujos de calor y temperatura son medidas que se relacionan con las transiciones térmicas en los materiales. En este trabajo se estudia la transición de fase gel a líquido cristalino de las membranas bilipídicas de liposomas. A una temperatura baja, los liposomas se encuentran en un estado gel, donde los fosfolípidos de la bicapa se encuentran organizados fuertemente de forma compacta por fuerzas de van der Waals y cuando en el proceso se presenta una transición de fase debido a la absorción de calor provoca un aumento en desorden en la membrana, debido a que se pierden interacciones entre las colas de los fosfolípidos, lo cual facilita la transición de fase acompañada de un aumento en la permeabilidad de la bicapa [17].

3.2.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Fundamento de la técnica e instrumentación

Es una técnica analítica de alta sensibilidad utilizada para medir el calor generado o absorbido en interacciones moleculares debido a que muchos procesos están asociados con algún tipo de actividad térmica, es decir, un cambio de entalpía, ΔH . Consiste en una serie consecutiva de inyecciones de una muestra líquida mediante una jeringa hacia una celda calorimétrica en el equipo bajo condiciones isotérmicas. El calor de reacción es cuantificado en función del número de inyección o la concentración.

Los estudios de ITC, se realizaron con el equipo Thermal Activity Monitor (TAM, Thermometric, Suecia), cuenta con cuatro unidades calorimétricas, que funcionan de forma independiente, lo cual permite realizar simultáneamente diferentes experimentos. Cada unidad calorimétrica cuenta con dos celdas de acero inoxidable, con capacidad de 4mL, una celda para contener la muestra y otra celda para el material de referencia. El calorímetro TAM es un sistema de alta sensibilidad que puede detectar flujos de calor de hasta $0.1\mu W$, en una temperatura de selección de entre $5^{\circ}C$ a $90^{\circ}C$. Trabaja en forma de configuración diferencial, es decir, una celda actúa como celda de reacción y la otra como referencia.



Figura 3.6. Representación de equipo TAM, Thermometric, Suecia y sus diferentes compartimentos.

El modo de trabajo es isotérmico, donde las celdas del TAM se encuentran reguladas por un termostato de agua para mantener la temperatura constante. En estos experimentos se detecta el calor generado o absorbido en la celda de

muestra debido al fenómeno físico o químico que se presenta en cada inyección durante la titulación. La diferencia de temperatura generada entre la celda de la muestra y la celda de la referencia es restablecida por un modo de compensación de potencial, para mantener las celdas a la misma temperatura [6].

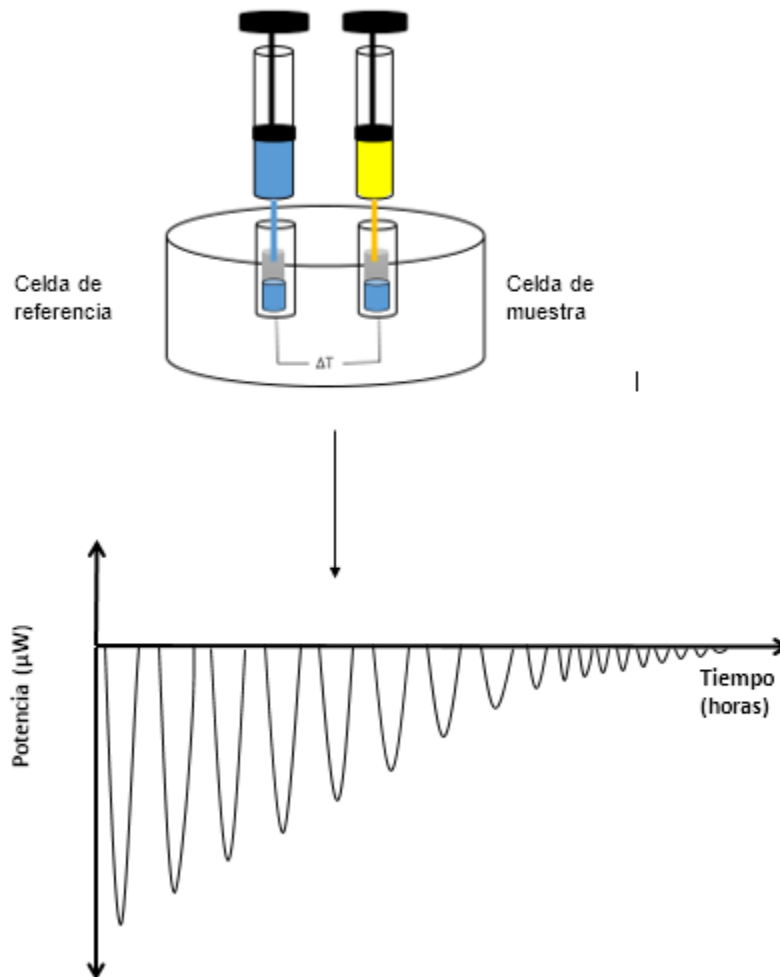


Figura 3.7. Diagrama representativo de un modo de compensación de potencia por ITC. El equipo brinda una señal relacionada a la potencia aplicada para mantener la celda de referencia y muestra a la misma temperatura durante cada inyección realizada.

Capítulo IV. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.0 Formación de película

Tabla 4.0. Sistemas elaborados por el método de hidratación.

Sistema liposomal

- 1 DSPC (10 mM)
- 2 DSPC: CHOL (4:1),
- 3 DSPC: CHOL: IBU (8:1.7:1)
- 4 DSPC: IBU (8:1)

- El primer sistema liposomal está formado por el fosfolípido DSPC, elaborado a una concentración de 10 mM, la cual se mantiene hasta antes de la titulación con el tensoactivo OGP. Los siguientes 3 sistemas, se obtienen de la combinación del DSPC con el ibuprofeno y colesterol en una proporción molar tal como se indica entre paréntesis en tabla 4.0.
- Disolver los reactivos en diclorometano para elaborar cada uno de los 4 sistemas liposomales.
- Si la suspensión anterior se muestra turbia, agregar etanol al 98 % (200 μ L) hasta su completa disolución.
- Evaporar el disolvente en rotavapor a 70 rpm, 45 °C y en condiciones de vacío para la formación de la película en el matraz bola durante 45 minutos.
- Después de la evaporación del disolvente agregar agua desionizada como medio de dispersión a la película formada a una temperatura de 55°C.
- Si la suspensión de liposomas presenta agregados visibles, someter a sonicación durante 30 minutos.
- Realizar el proceso de extrusión de la suspensión de cada uno de los sistemas por 15 veces utilizando una membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 100 nm a una temperatura de 55 °C.

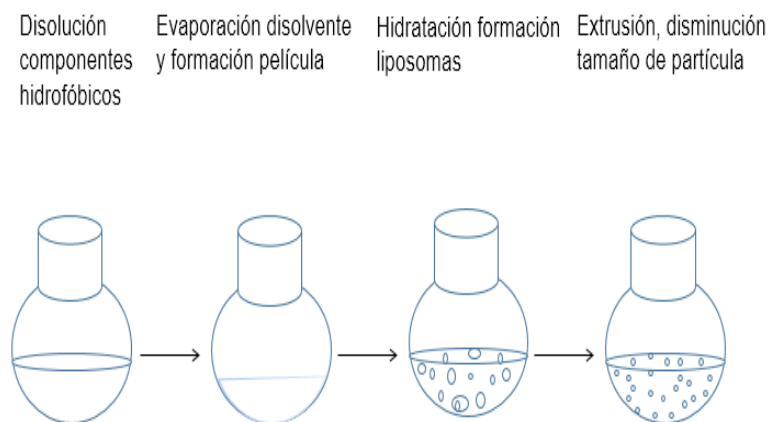


Figura 4.0. Representación general de la formación de liposomas por el método hidratación [12].

4.1 Metodología dispersión dinámica de luz

El análisis de tamaño de partícula por DLS, se realizó con el equipo NICOMP 380 ZLS Particle Sizer. Se estudiaron los sistemas elaborados por el método de hidratación de película y la técnica de ITC para la obtención de las vesículas, como se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Sistemas liposomales antes y después de la titulación.

Sistema liposomal	
1	DSPC
2	DSPC: CHOL
3	DSPC: IBU
4	DSPC: CHOL: IBU
ITC	
5	DSPC vs OGP
6	DSPC: CHOL vs OGP
7	DSPC: CHOL: IBU vs OGP
8	DSPC: IBU vs OGP

Se colocó 1 ml de la suspensión de los sistemas en una celda de cuarzo bajo las siguientes condiciones que se muestran en tabla 4.1.2.

Tabla 4.1.2. Condiciones experimentales de análisis de DLS.

Temperatura	25 °C
Viscosidad del medio	0.8902 cPoise
Índice de refracción del medio	1.333
Longitud de onda del laser	632.8 nm
Ángulo de dispersión	90 grados
Tiempo de análisis	10 minutos

El tiempo de análisis se estableció por 7 días o hasta observar la presencia de precipitación [18,12]



Figura 4.1. Imagen del equipo NICOMP 380 ZLS Particle Sizer, con el que se realizó el análisis de tamaño de partícula y potencial Z por dispersión dinámica de luz y dispersión de luz electroforética respectivamente.

4.2 Metodología potencial Z

La determinación del potencial Z de los sistemas que se muestran en la tabla 4.1, se realizaron por dispersión de luz electroforética (ELS) con el equipo NICOMP 380 ZLS Particle Sizer, bajo las condiciones como se muestra en la siguiente tabla 4.2.

Tabla 4.2. La tabla muestra las condiciones experimentales para el análisis de potencial Z [19].

Temperatura	25 °C
Viscosidad del medio	0.8902 cPoise
Índice de refracción del medio	1.333
Longitud de onda del laser	632.8 nm
Angulo de dispersión	14.0636 grados
Constante dieléctrica	78.5
Espacio entre electrodos	0.4 cm
Fuerza del campo eléctrico	10 V/cm

4.3 Metodología calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de DSC se realizó para todos los sistemas liposomales, antes y después de la titulación con el tensoactivo OGP de la tabla.4.1

- Se desgasificó 1mL de la suspensión de liposomas y 1 mL de agua desionizada.
- Se colocaron 515.5 μ L de suspensión y 515.5 μ L de agua en la celda de muestra y referencia respectivamente.

- El compartimento de las celdas se cerró hasta ajustar la presión del sistema VP-DSC a 44.11 p.s.i. inicial.
- Las condiciones de análisis fueron, 5 barridos en intervalo de temperatura de 25 °C a 65 °C, y normalizando la concentración del fosfolípido en la muestra.
- El análisis de datos se realizó con el software VP-DSC para la obtención de los parámetros ΔH , T_m y $T_{1/2}$.



Figura 4.2. Equipo [Microcal](#) VP-DSC empleado para determinación de los parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales antes y después de la titulación calorimétrica con el tensoactivo no iónico OGP[12].

4.4 Metodología calorimetría de titulación isotérmica

La técnica calorimétrica se realizó en el equipo Thermal Activity Monitor (TAM, Thermometric, Suecia) donde se analizaron los sistemas que se muestran en la tabla 4.1 de este capítulo.

- Se colocó en las celdas de reacción 1.6 ml de OGP 15 mM y se adaptaron a las jeringas de inyección de 2500 μ L con la suspensión liposomal.
- EL experimento se corrió a la temperatura controlada de 25 °C y una sensibilidad del equipo a 100 μ w.
- En este experimento se realizaron 30 inyecciones 50 μ l de la suspensión en periodos de 25 minutos.
- El área bajo la curva de cada pico debido a cada inyección y el cual representa el ΔH del proceso, se obtuvo por medio del software Digitam [12]

Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.0. Dispersión dinámica de luz (DLS), potencial Z, microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los resultados obtenidos por la técnica de dispersión dinámica de luz y potencial Z nos proporcionaron el comportamiento de la estabilidad de las suspensiones liposomales. Debido a que los liposomas son termodinámicamente inestables, se estableció un periodo de tiempo de estudio de 7 días o hasta la observación del inicio de la formación de precipitación.

5.1.1. Sistemas DSPC y DSPC-OGP

5.1.1.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z.

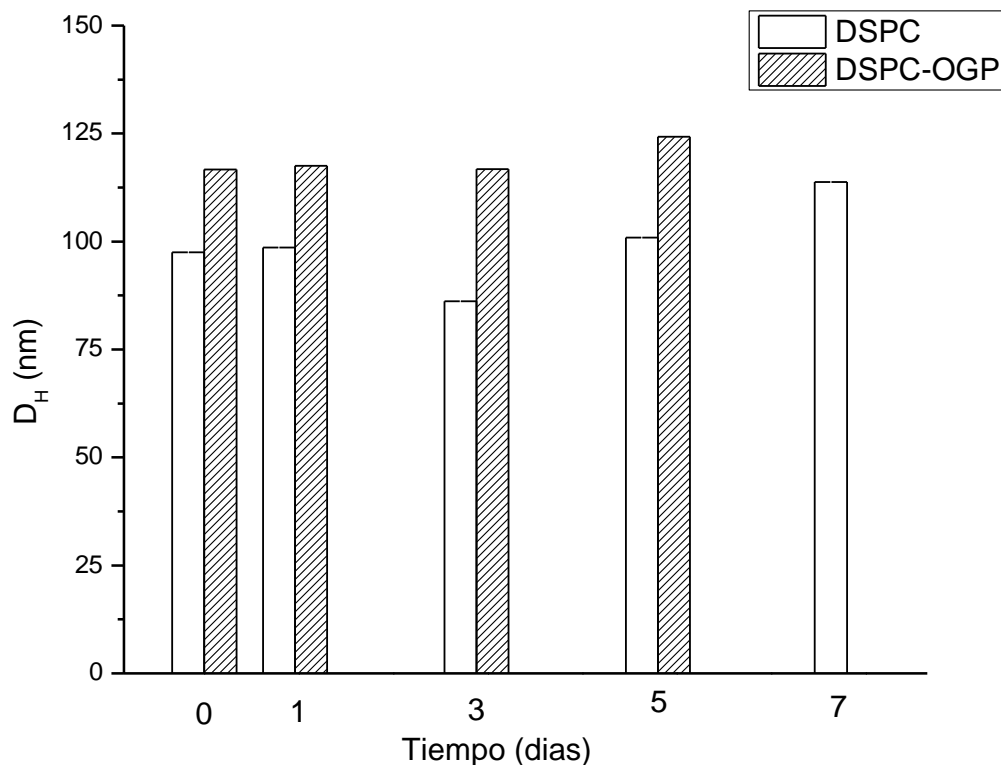
El sistema DSPC a los 13 días de su elaboración presenta aglomeración, mientras que el sistema precipita a los 7 días después de su titulación isotérmica con el tensoactivo no iónico OGP. El sistema DSPC resulta ser estable debido a que presenta un potencial de 30 mV, el cual es un potencial que favorece mayormente la repulsión entre liposomas. Con la adición de OGP, como se muestra en la tabla (5.0.1), el potencial Z disminuye aproximadamente el 50%, debido a que los monómeros de OGP, se insertan en la bicapa y desplazan a las moléculas de agua de la interfase entre el liposoma y el medio de dispersión, dado que las fuerzas de atracción aumentan con respecto al sistema DSPC puro, y se favorece la interacción entre liposomas de DSPC-OGP adyacentes, en donde se puede presentar la fusión entre liposomas, dando lugar a partículas de mayor tamaño, así también por la inserción del tensoactivo OGP en la membrana.

Este fenómeno se muestra en la figura (5a), el aumento de tamaño implica un menor coeficiente de difusión, es decir, menor movimiento Browniano y aumento de la velocidad de sedimentación.

Tabla 5.1.1. Diámetro hidrodinámico promedio en nm, los valores del índice de polidispersión (P.I.) y el potencial zeta promedio en mV de liposomas elaborados con DSPC y DSPC-OGP durante el tiempo de monitoreo de la estabilidad.

Tiempo (días)	DSPC (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)	DSPC-OGP (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)
0	97.5	0.219	30.33	116.7	0.193	19.59
1	98.6	0.196	31.98	117.5	0.188	17.65
3	86.2	0.438	32.37	116.8	0.202	9.16
5	100.9	0.202	20.91	124.3	0.265	9.39
7	113.8	0.150	23.41			

El valor de P.I. menor a 0.1 indica un sistema de partículas monodisperso, los valores obtenidos en estos sistemas muestran un P.I. mayor a 0.1 indicativo de un tamaño de partícula polidisperso.



Gráfica 5.1.1. *Tamaño de partícula promedio en función del tiempo, de los sistemas DSPC y DSPC-OGP, durante el tiempo que los liposomas permanecieron en suspensión. En este gráfico se observa que el tamaño de partícula aumenta con el transcurso del tiempo en el sistema DSPC, así también cuando es titulado con el tensoactivo no iónico OGP para obtener el sistema DSPC-OGP*

5.1.1.2. Microscopia electrónica SEM y TEM

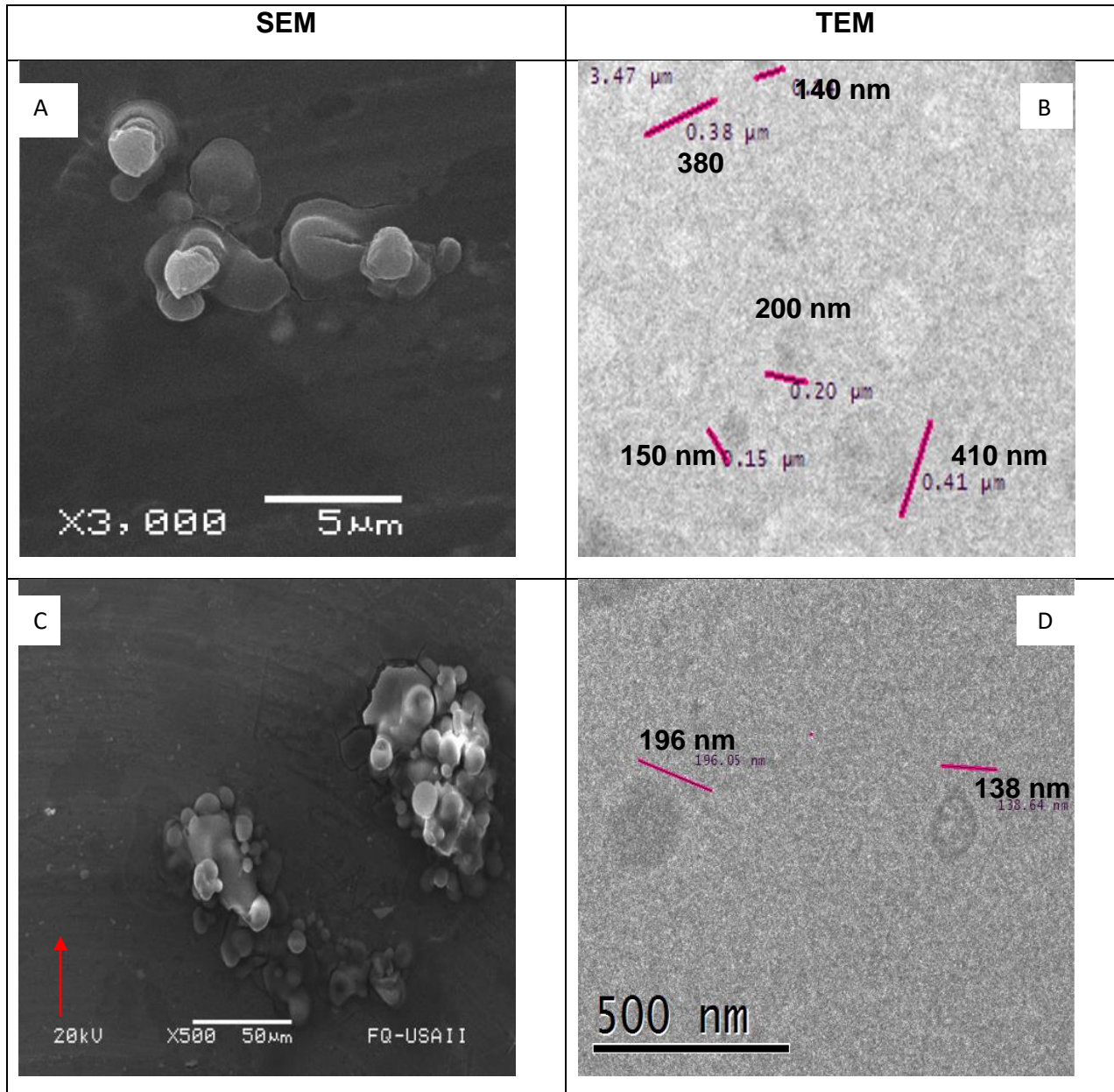


Figura 5.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) de sistemas DSPC y DSPC-OGP. SEM DSPC (A), DSPC-OGP(C) y TEM DSPC (B), DSPC-OGP (D).

En SEM (A) y (C) se observan estructuras esféricas e irregulares aglomeradas y liposomas de menor tamaño aisladas y señaladas en (C). En TEM (B y D) se aprecia partículas aglomeradas, en donde las partículas aisladas presentan un tamaño comparable al encontrado por medio de DLS.

5.1.2 Sistema DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP

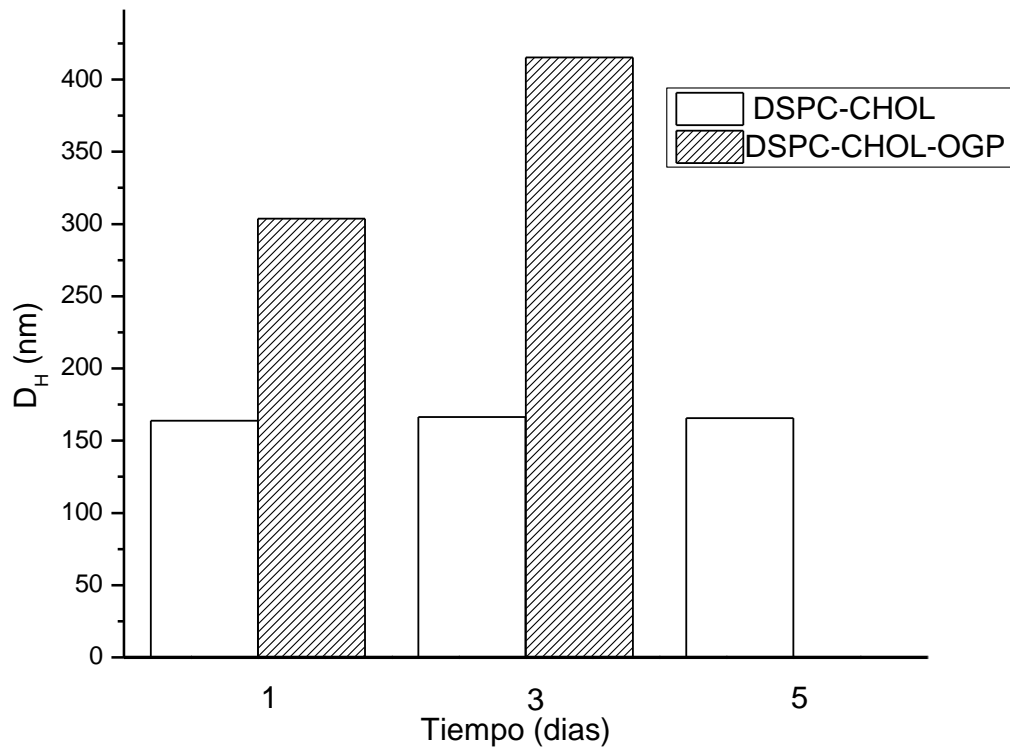
5.1.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z.

El sistema DSPC-CHOL inicia la precipitación a los 5 días de su elaboración, mientras que el sistema DSPC-CHOL-OGP a las 72 horas. El diámetro promedio de los liposomas de DSPC-CHOL aumenta y el potencial Z disminuye con respecto al sistema DSPC. La disminución del potencial Z como se muestra en la tabla (5.1.2) para los liposomas constituidos por DSPC-CHOL posiblemente debido a que el colesterol que modifica la composición de la membrana, genera cambios en el área superficial provocando una disminución de la carga y facilita interacción entre los liposomas, que luego precipitan por acción de la fuerza de gravedad.

El sistema DSPC-CHOL-OGP aumenta el tamaño de partícula por la inserción del tensoactivo OGP, así mismo se mantiene en suspensión ya que el tensoactivo no iónico, que presenta un mayor carácter hidrofílico, permite que los liposomas con respecto al sistema DSPC-CHOL de manera muy dispersa (P.I. mayor a 0.1), tal como se muestra en la tabla (5.0.2) y en la imagen de microscopía electrónica de barrido, donde se muestran liposomas muy fusionados

Tabla 5.1.2. Muestra el diámetro hidrodinámico (D_H) promedio en nm, los valores del índice de polidispersión (P.I.) y el potencial zeta promedio en mV de liposomas elaborados con DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP.

Tiempo (días)	DSPC-CHOL (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)	DSPC-CHOL-OGP	P.I.	Potencial Z (mV)
1	163.9	0.23	-4.47	303.7	0.664	0.31
3	166.4	0.23	-3.92	415.2	0.746	0.00
5	165.7	0.21	+2.08			



Gráfica 5.1.2. *Tamaño de partícula promedio en función del tiempo, de los sistemas DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP durante el monitoreo de la estabilidad. En este gráfico se observa que el tamaño de partícula aumenta cuando el sistema DSPC-CHOL es titulado con el tensoactivo no iónico OGP para obtener el sistema DSPC-CHOL-OGP*

5.1.2.2. Microscopia electrónica SEM y TEM

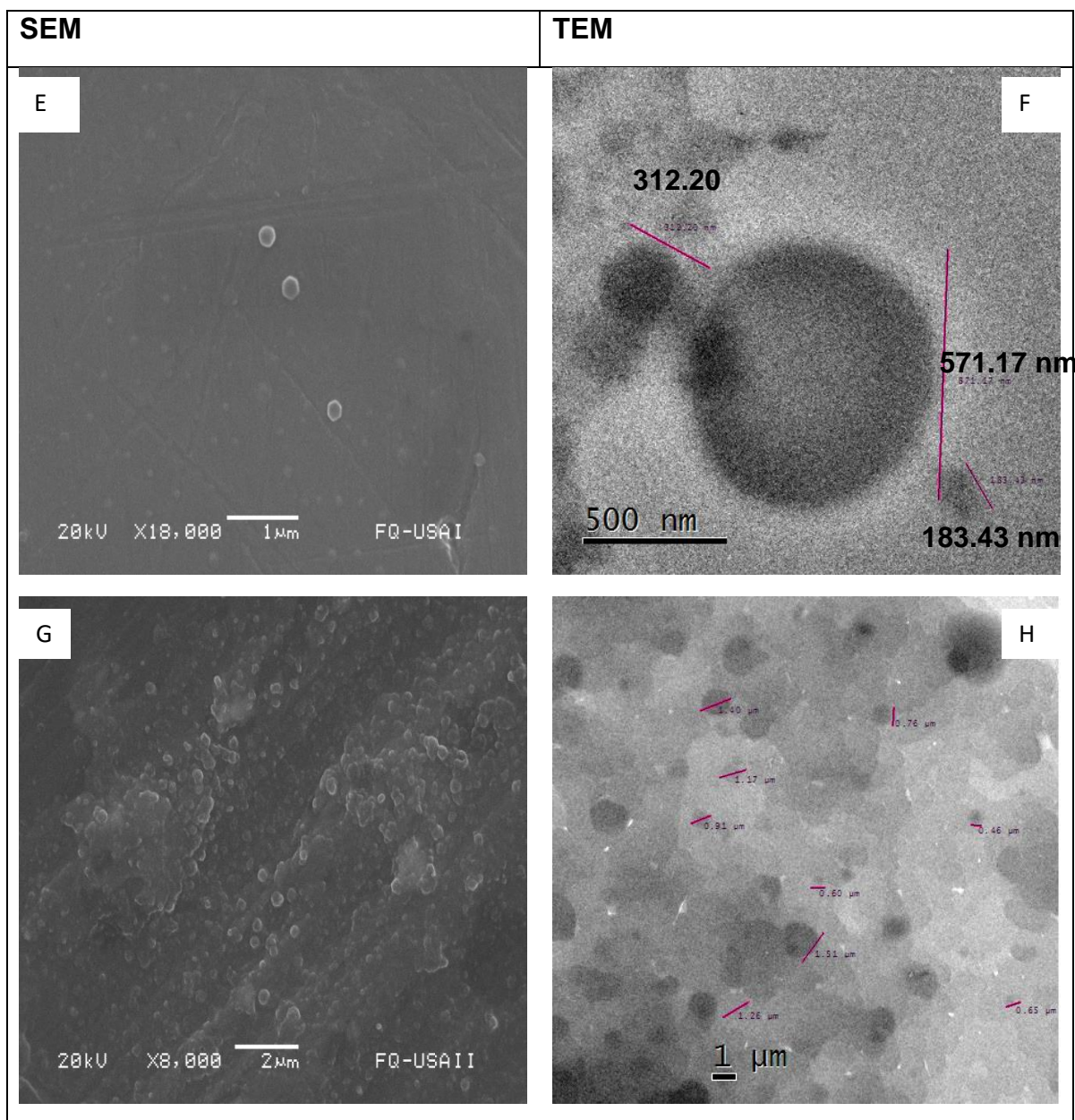


Figura 5.1.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) de sistemas DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP. SEM DSPC-CHOL (E), DSPC-CHOL-OGP (G) y TEM DSPC-CHOL-(F) DSPC-CHOL-OGP (H) .

En SEM del sistema DSPC-CHOL se observan liposomas esféricos irregulares de diámetro menor a un micrómetro en (E). En SEM, el sistema DSPC-CHOL-OGP muestra liposomas con tendencia esférica, altamente aglomerados señaladas en (G). En TEM (F y H) se observan liposomas de un tamaño mayor a 100 nm,

posiblemente debido a la fusión de DSPC-CHOL (F), y de DSPC-CHOL-OGP respectivamente. También se observan liposomas del tamaño que corresponde con el valor encontrado por la técnica de DLS, que se muestran en la tabla (5.1.2). En TEM, los sistemas DSPC-CHOL (F) y DSPC-CHOL-OGP (H) muestran liposomas aglomerados donde el P.I. es mayor a 0.1, lo cual es confirmado por los resultados obtenidos por DLS; también, se pueden apreciar liposomas aislados, así como posibles liposomas dentro de otros liposomas (zonas más oscuras) cuya formación es inducida fusión entre liposomas adyacentes.

5.1.3 Sistema DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP

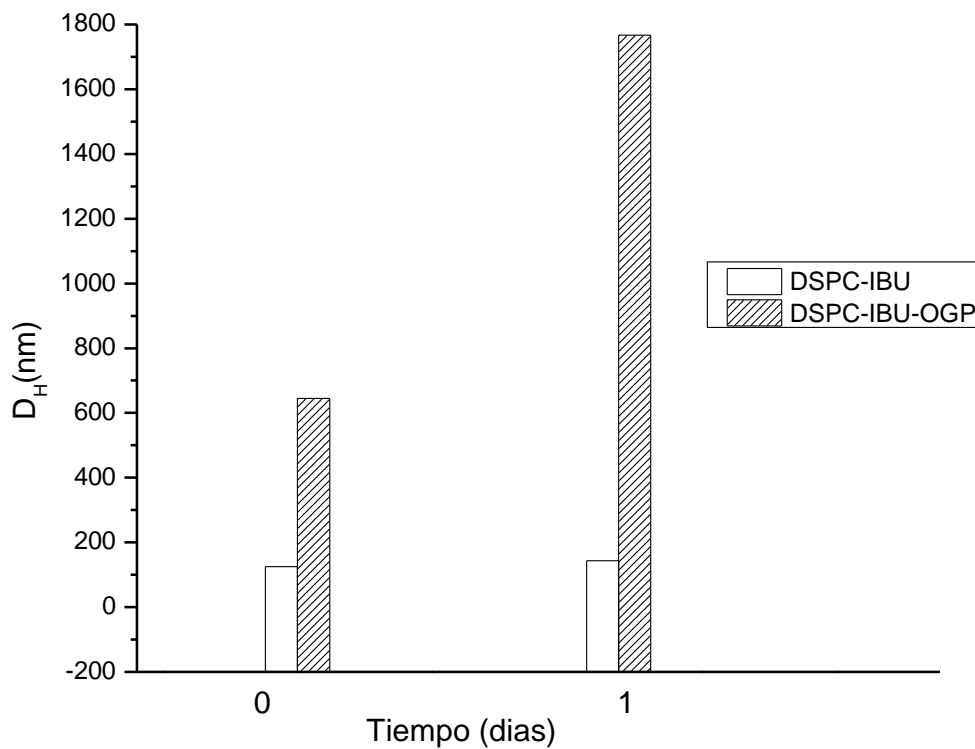
5.1.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z

El sistema de liposomas de DSPC-IBU presenta muy baja estabilidad, ya que a las 48 horas de su elaboración inicia la precipitación, y para el sistema de vesículas mixtas de DSPC-IBU-OGP a las 24 horas.

El sistema DSPC-IBU presenta polidispersión en el tamaño de partícula, donde es P.I. mayor a 0.1 como se muestra en la tabla (5.0.3); y el valor de potencial Z es muy cercano a cero, motivo por el cual la repulsión electrostática entre liposomas es muy baja y se facilita la agregación. Estudios de RMN protónica han mostrado que la carga negativa del grupo carboxilo del ibuprofeno puede interactuar con la carga positiva del grupo trimetil de las cabezas de colina de los fosfolípidos, tal como fosfatidilcolina [22]. La neutralización de cargas promovida por el ibuprofeno también elimina la repulsión electrostática entre los principales grupos polares de los fosfolípidos lo que permite un mejor reacomodo de las cadenas hidrocarbonadas [23,24].

Tabla 5.1.3. Diámetro hidrodinámico (D_H) promedio en nm, los valores del índice de polidispersión (P.I.) y el potencial zeta promedio (Z) en mV, de liposomas elaborados con DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP.

Tiempo (días)	DSPC-IBU (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)	DSPC-IBU-OGP (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)
0	125.4	0.202	0.0	644.6	0.720	1.19
1	143.5	0.454	1.47	1766.6	0.640	4.55



Gráfica 5.1.3 *Tamaño de partícula en función del tiempo, en que los liposomas de los sistemas DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP permanecieron en suspensión. En este gráfico, se observa que el tamaño de partícula aumenta a una magnitud del orden de μm para el sistema DSPC-IBU-OGP y a las 24 horas ocurre la precipitación. El sistema DSPC-IBU del mismo modo precipita a las 24 horas por un potencial cercano a cero.*

5.1.3.2. Microscopía electrónica SEM y TEM

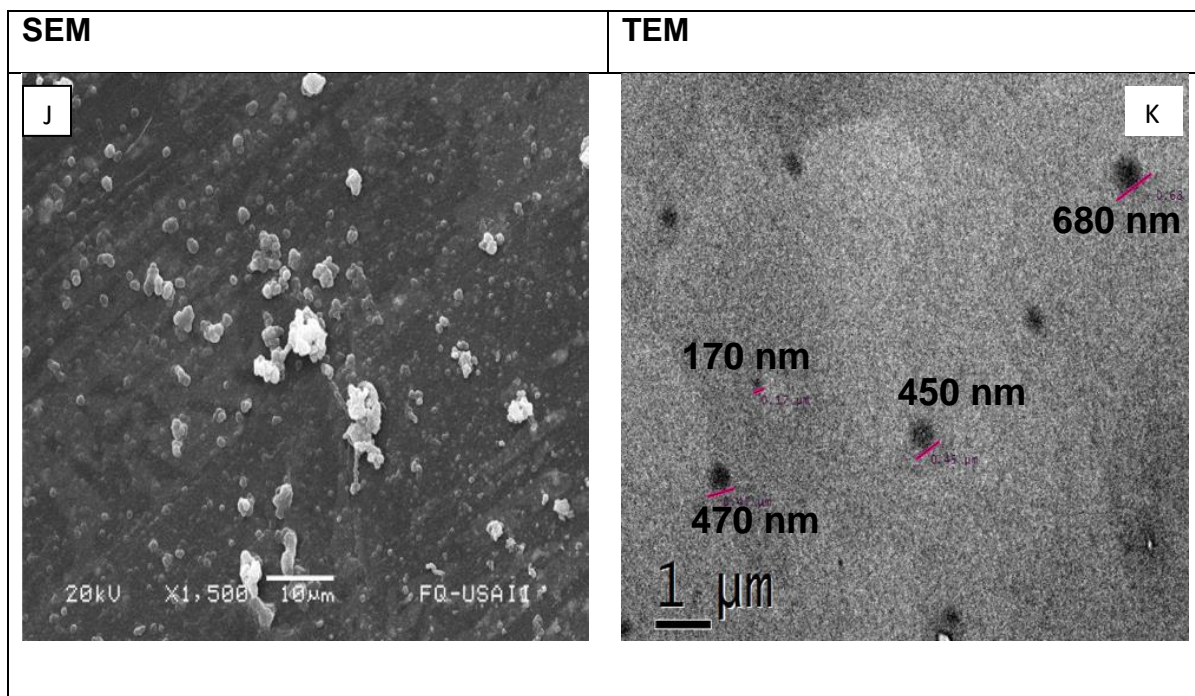


Figura 5.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los sistemas DSPC-IBU y DSPC-IBU. SEM (J) y TEM (K) del sistema DSPC-IBU respectivamente. La microscopía SEM y TEM del sistema DPSC-IBU-OGP, no se presenta debido a que se presenta separación de fases antes del tiempo que dura su elaboración por la técnica calorimétrica ITC

5.1.4 Sistema DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP

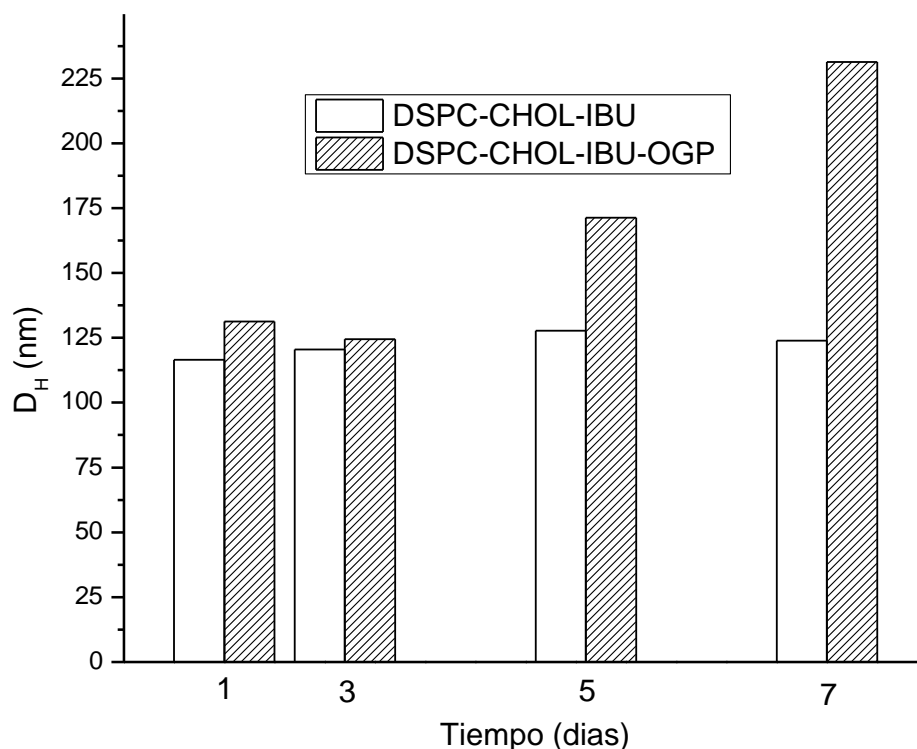
5.1.4.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z

Los sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP presentan un tamaño de partícula polidisperso y que tiende a aumentar con el tiempo (tabla y gráfica 5.1.4). El D_H es de alrededor de los 100 nm, esto favorece que los liposomas se mantengan en suspensión por acción del movimiento Browniano. También se observa que el potencial Z del DSPC-CHOL-IBU desciende con respecto al sistema DSPC, el cual presenta el mayor valor de potencial (30 mV), de ahí la razón de que el sistema DSPC-CHOL-IBU sea menos estable. La adición del tensoactivo OGP al sistema DSPC-CHOL-IBU por medio de ITC, dio lugar a liposomas con mayor D_H que también crece con el tiempo (gráfica 5.1.4). El aumento de tamaño del sistema DSPC-CHO-IBU-OGP es mayor comparado con el sistema DSPC-CHOL-IBU, esto posiblemente se deba a que, la presencia del

ibuprofeno (que tiene una tendencia a acumularse en la región hidrofóbica de las cadenas de acilo de los fosfolípidos de la bicapa) y la presencia de colesterol en un intervalo de 0 a 25 % en mol, provocan un aumento en el orden de las cadenas hidrocarbonadas, y este hecho está relacionado con una baja inserción del tensoactivo no iónico (OGP) en la bicapa del liposoma, el cual es capaz de modificar la membrana para aumentar su tamaño.

Tabla 5.1.4 Diámetro hidrodinámico (D_H) promedio en nm, los valores del índice de polidispersión (P.I.) y el potencial zeta promedio en mV de liposomas elaborados con DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP.

Tiempo (días)	DSPC-CHOL-IBU (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)	DSPC-CHOL-IBU-OGP (nm)	P.I.	Potencial Z (mV)
1	116.5	0.316	6.89	131.28	0.156	-2.15
3	120.5	0.320	11.0	124.5	0.332	0.89
5	127.7	0.365	8.93	171.35	0.500	7.41
7	123.9	0.339	9.23	231.28	0.674	5.95



Gráfica 5.1.4. Diámetro hidrodinámico (D_H) en función del tiempo de los sistemas de DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP, durante el monitoreo de la

estabilidad. En este gráfico se observa que el D_H aumenta cuando el sistema DSPC-CHOL-IBU es titulado con el tensoactivo no iónico OGP para obtener el sistema DSPC-CHOL-IBU-OGP.

5.1.4.2. Microscopía electrónica SEM y TEM

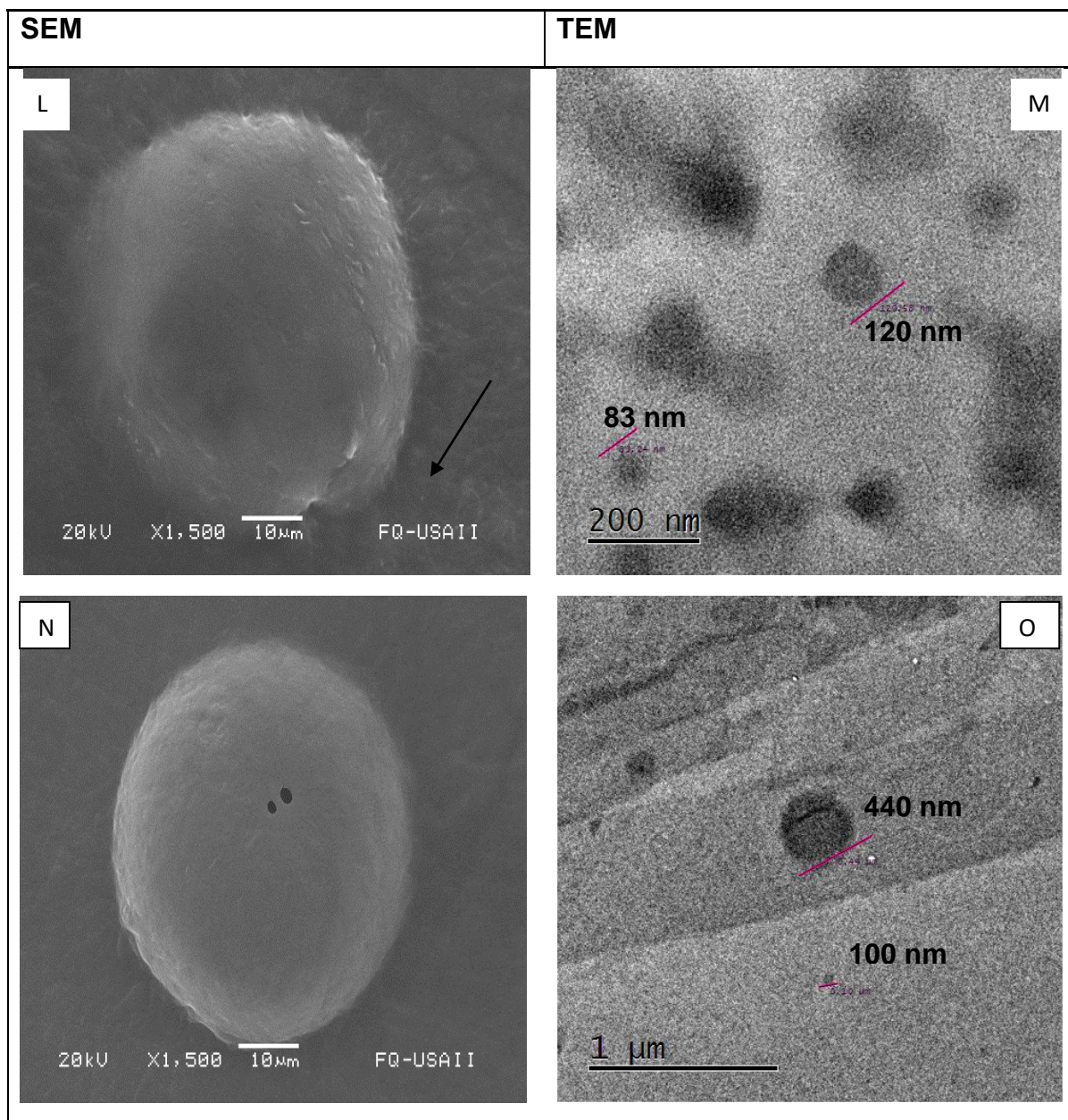
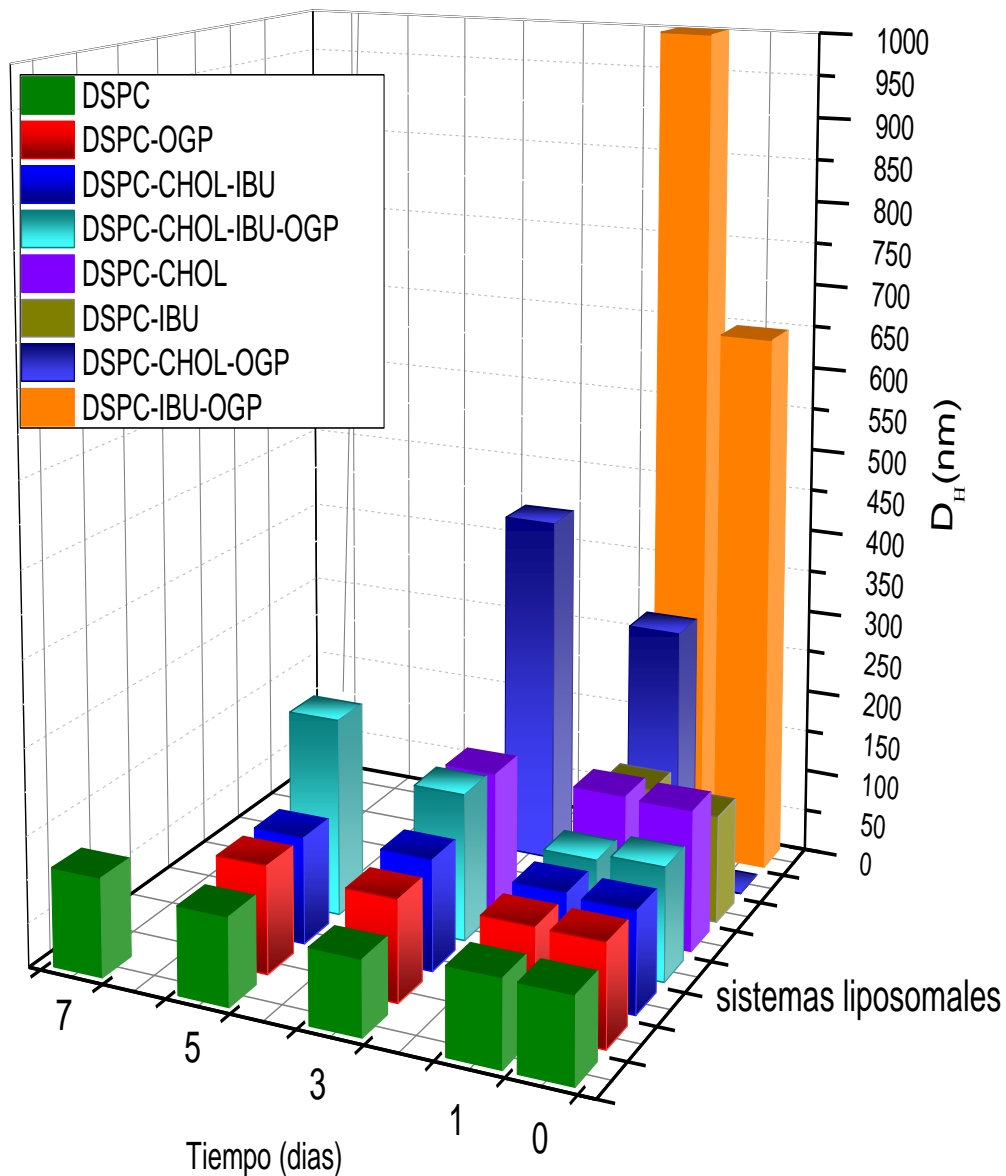


Figura 5.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP. SEM: DSPC-CHOL-IBU (L), DSPC-CHOL-IBU-OGP (N) y TEM: DSPC-CHOL-IBU (M) DSPC-CHOL-IBU-OGP (O)

En la figura 5.1.4, en SEM (L y N) se muestra que los sistemas tienen una tendencia a formar vesículas de mayor tamaño comparados con aquellos sistemas formados únicamente por DSPC, posiblemente porque se presenta aglomeración y fusión de bicapas lipídicas. Cuando los sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP, se analizan por TEM, se logra ver liposomas unilamerales aislados, así como fusionados en ambos sistemas y el D_H estimado coincide con el valor obtenido por DLS.

5.1.4.3. Resumen del estudio tamaño de partícula de los sistemas liposomales



Gráfica 5.1.5. Diámetro hidrodinámico (D_H) de los liposomas en función del tiempo en que permanecen estables, antes y después de la titulación con el tensoactivo OGP por ITC. Por ejemplo el sistema DSPC, se mantiene estable por más de 7 días, mientras que el sistema DSPC-IBU-OGP, se mantiene estable por 1 día; después de estos tiempos se presenta separación de fases.

La gráfica 5.1.5 muestra los sistemas ordenados de manera decreciente de estabilidad. Se puede observar, que los sistemas DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP forman agregados del orden de μm , debido a que poseen un potencial Z cercano a cero, lo que indica que aumenta la interacción entre liposomas adyacentes (ver tablas de la 5.1.1 a 5.1.3). Los sistemas de fosfolípido que contienen colesterol, son menos estables con respecto al sistema DSPC, debido a que el colesterol disminuye el potencial Z por una reducción de carga de la membrana.

5.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En el análisis por la técnica de DSC se presentan parámetros termodinámicos obtenidos de los sistemas, antes y después de la titulación con el tensoactivo no iónico OGP por ITC, principalmente, la temperatura de transición principal (T_m), amplitud del ancho de la traza calorimétrica a media altura $T_{1/2}$, la entropía y entalpía del proceso de transición de fase (ΔS y ΔH respectivamente). Además, se presentan las deconvoluciones de los termogramas en donde se observa asimetría.

5.2.1. Sistema DSPC y DSPC-OGP

El sistema elaborado únicamente por el fosfolípido DSPC muestra un termograma (gráfica 5.2.1.) simétrico y estrecho ($T_{1/2} = 0.86$), la temperatura de transición de 53.64 ± 0.18 °C y la entalpía de 10.55 ± 0.17 kcal mol⁻¹ tal como se muestra en la tabla 5.2.1. Este resultado coincide con aquéllos reportados en la literatura [11,15]. El termograma del sistema DSPC-OGP es simétrico, pero presenta una mayor amplitud, es decir, aumentó la $T_{1/2}$, lo cual es indicativo de una transición de fase menos cooperativa. La disminución de la cooperatividad molecular se debe principalmente a que la partición del tensoactivo no iónico OGP en la bicapa lipídica del sistema DSPC (figura 5.2.1) e interrumpe el orden estructural (aumenta la entropía del sistema) de las cadenas alifáticas, esto implica una mayor inversión de energía (12.82 ± 0.60 kcal mol⁻¹) para lograr la transición de fase gel hacia la fase fluida comparado con el fosfolípido puro. La Temperatura de transición principal, T_m , del sistema DSPC-OGP de este sistema disminuyó 5 °C, es decir, pierde estabilidad térmica, por la pérdida de inclinación de las cadenas hidrofóbicas con respecto al sistema DSPC.

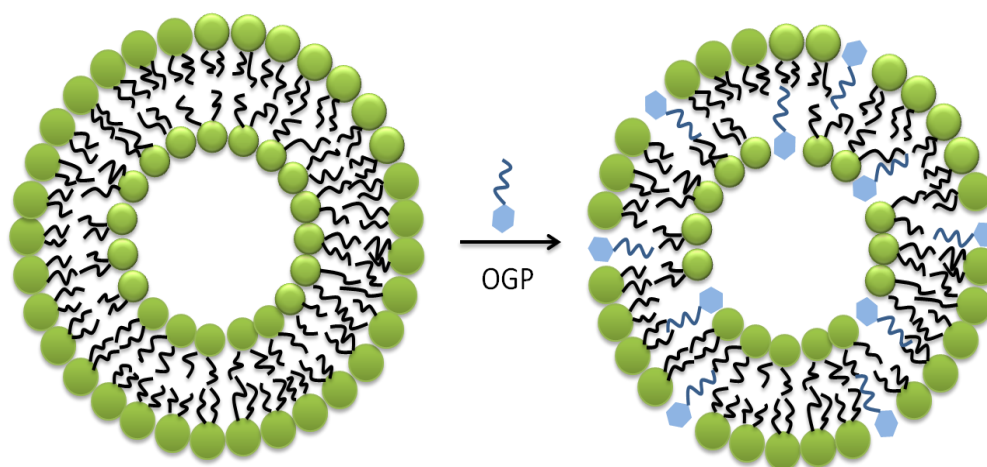
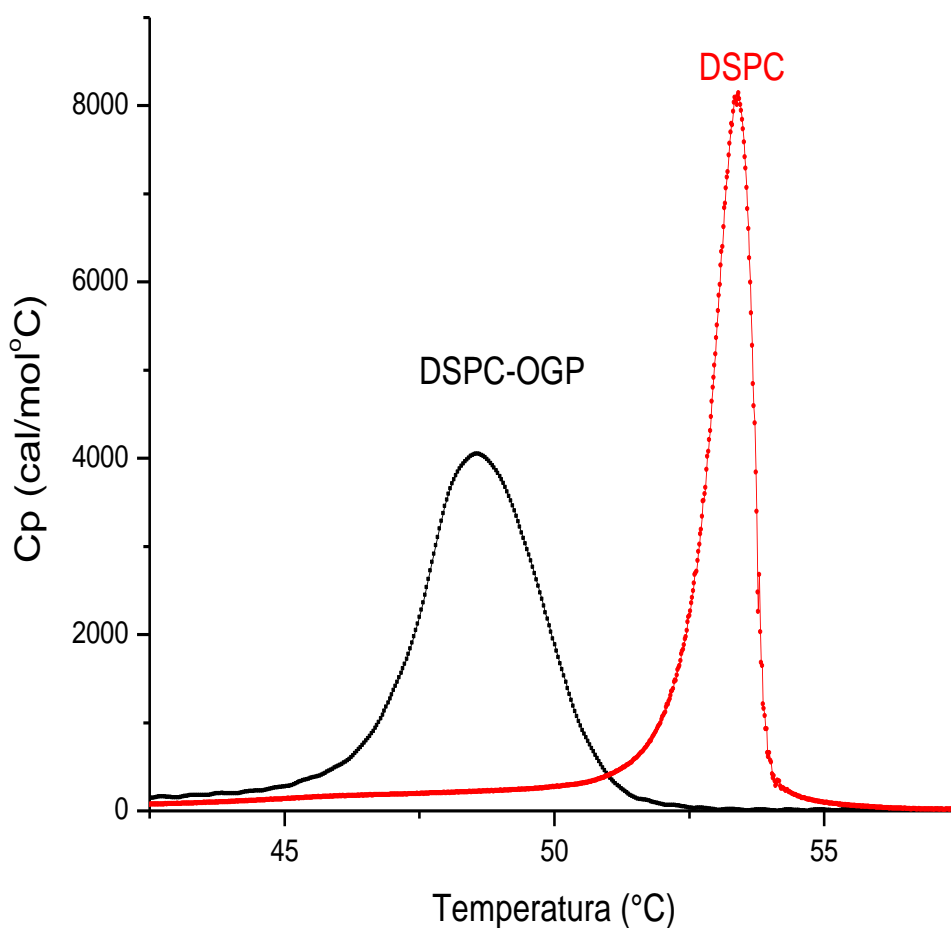


Figura 5.2.1. Muestra cómo el tensoactivo OGP probablemente se distribuye de manera homogénea en el liposoma de DSPC.

Tabla 5.2.1. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC de los sistemas DSPC y DSPC-OGP.

Sistema	T _m (°C)	T 1/2	ΔH (kcalmol ⁻¹)	ΔS(calK ⁻¹ mol ⁻¹)
DSPC	53.64 ± 0.18	0.86 ± 0.007	10.55 ± 0.17	32.30 ± 0.04
DSPC-OGP	48.58 ± 0.042	2.582 ± 0.04	12.82 ± 0.60	39.84 ± 0.4



Gráfica 5.2.1. Termogramas de los sistemas DSPC y DSPC-OGP. Ambas Trazas calorimétricas son endotérmicas. El gráfico de DSPC muestra simetría y es angosto, mientras para el sistema DSPC-OGP se obtiene un gráfico simétrico, pero aumenta su amplitud con respecto a DSPC.

5.2.2. Sistema DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP

Al agregar colesterol al sistema DSPC se obtiene un termograma simétrico, donde disminuyen la T_m y el ΔH , mientras $T_{1/2}$ aumenta, con respecto al sistema DSPC. El colesterol disminuye la entropía del sistema, esto implica mayor orden, por tal razón la transición de fase se realiza con menor ΔH , y la T_m se mantiene en 51.60 ± 0.16 °C, este resultado es cercano a la T_m del sistema DSPC (53.64 ± 0.18 °C), por lo que se deduce que el colesterol disminuye la estabilidad térmica. La presencia de colesterol favorece el paso al estado de cristal líquido, por lo que la transición del estado gel al estado cristal líquido sucede a una temperatura menor. Una razón para que esto suceda es la extensión de las cadenas hidrofóbicas del fosfolípido que interactúan con las moléculas de colesterol, esto proporciona movilidad rotacional [12].

La adición del OGP al sistema DSPC-CHOL, disminuye el valor de la T_m de éste último, pero se obtiene un aumento de $T_{1/2}$, ΔH y ΔS , como se muestra en la tabla 5.2.2. La presencia de OGP provoca un aumento del desorden, con ello, una disminución de la cooperatividad, lo cual implica una mayor inversión de energía para lograr la transición de fase gel-líquido cristalino. El aumento de la entropía del sistema, posiblemente se debe a que el tensoactivo OGP, que presenta un HLB con mayor carácter hidrofílico ($HLB=12.24$), se encuentra en un medio lipídico hidrofóbico.

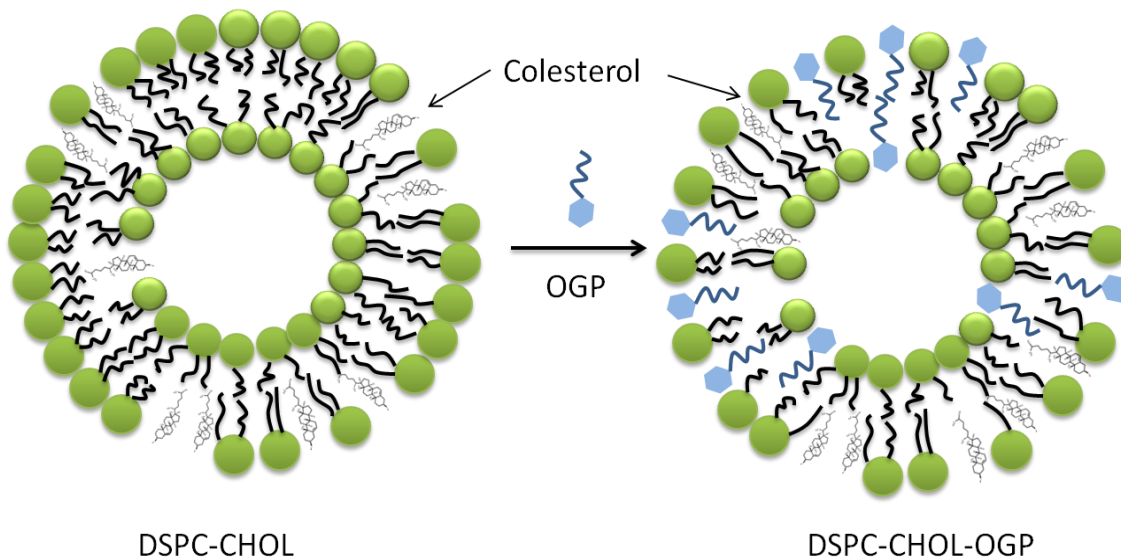
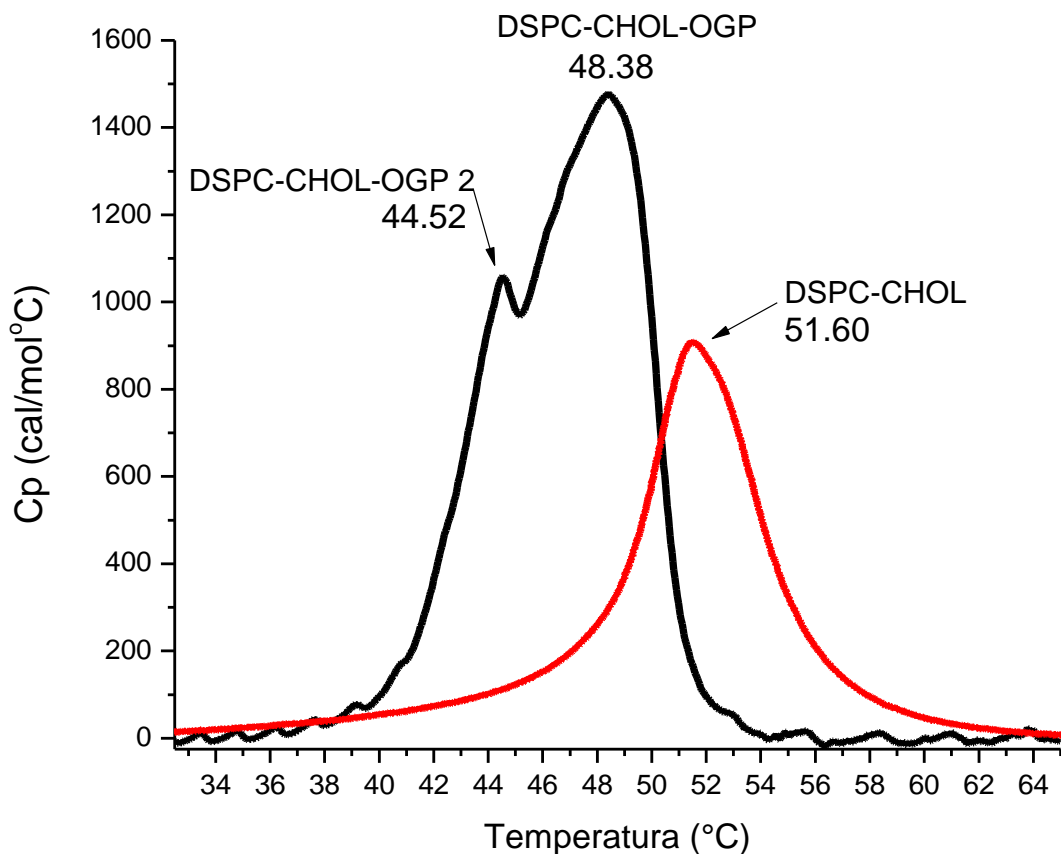


Figura 5.2.2. Muestra cómo el colesterol tiende a distribuirse de una manera no homogénea en la bicapa lipídica. Por otra parte al adicionar el tensoactivo OGP al sistema DSPC-CHOL, éste se distribuye de manera preferente en zonas con mayor proporción de fosfolípido.



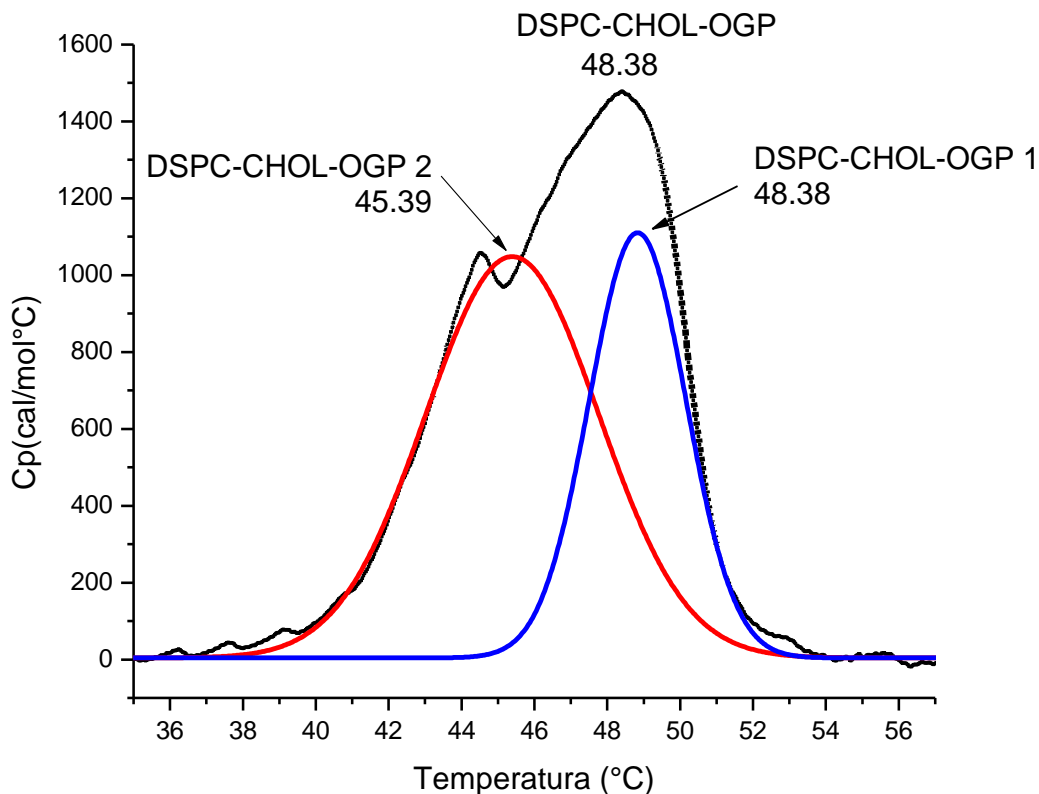
Gráfica 5.2.2. Termogramas de sistemas DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP, ambas señales indican que son procesos endotérmicos ($\Delta H > 0$). El sistema DSPC-CHOL-OGP, muestra dos transiciones de fase, es decir dos contribuciones diferentes en el sistema.

Tabla 5.2.2. Muestra los parámetros termodinámicos obtenidos por DSC de los sistema DSPC-CHOL y DSPC-CHOL-OGP, donde DSPC-CHOL-OGP 1 y DSPC-CHOL-OGP 2, representan las dos contribuciones endotérmicas obtenidas de la deconvolución del termograma DSPC-CHOL-OGP.

Sistema	T _m (°C)	T _{1/2}	ΔH (kcalmol ⁻¹)	ΔS (calmol ⁻¹ K ⁻¹)
DSPC-CHOL	51.60 ± 0.16	4.52 ± 0.43	6.08 ± 0.18	18.72 ± 0.20
DSPC-CHOL-OGP	48.38 ± 0.20	6.9 ± 0.046	10.20 ± 0.22	31.72 ± 0.06
DSPC-CHOL-OGP 1	48.38	2.65	3.682	11.45
DSPC-CHOL-OGP 2	45.39	4.75	6.20	19.51

En la gráfica 5.2.2 el termograma del sistema DSPC-CHOL-OGP, muestra dos transiciones de fase, un pico a 44.52 °C y otro a 48.38°C. La presencia de las dos transiciones fue el criterio para realizar la deconvolución del termograma.

Los parámetros termodinámicos de las dos contribuciones identificadas como DSPC-CHOL-OGP 1 y DSPC-CHOL-OGP 2, se presentan en la tabla 5.2.2, y el termograma de la deconvolución en la gráfica 5.2.2.1.



Gráfica 5.2.2.1. Termograma de DSPC-CHOL-OGP, en el que se realizó la deconvolución de las dos principales contribuciones endotérmicas. Se propone que la contribución de DSPC-CHOL-OGP 2 es una zona en la membrana con mayor contenido de tensoactivo OGP y la contribución DSPC-CHOL-OGP 1, una región con mayor cantidad de colesterol (dominios de colesterol).

Basándonos en la energía involucrada y la entropía en la transición de fase, podemos inferir que se presenta la inserción no homogénea del tensoactivo OGP en la membrana del liposoma DSPC-CHOL.

Al comparar las contribuciones termodinámicas de DSPC-CHOL-OGP 1 y DSPC-CHOL-OGP 2, se obtiene que el valor de entropía, entalpía y $T_{1/2}$, son de mayor magnitud para DSPC-CHOL-OGP 2, lo anterior implica una mayor cantidad del tensoactivo OGP en la bicapa del liposoma, ya que su presencia tiende a

aumentar la entropía, con ello aumenta el ΔH , pero disminuye la cooperatividad y por lo tanto la T_m del sistema.

La contribución termodinámica DSPC-CHOL-OGP 1 se atribuye a una zona en la membrana con mayor proporción de colesterol, dado que la presencia de colesterol en el DSPC disminuye la entropía y el ΔH en la membrana; la T_m se mantiene cercana al valor de referencia. Cuando entra en contacto el tensoactivo OGP, con la membrana, los valores de los parámetros termodinámicos no son modificados significativamente.

5.2.3 Sistema DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP

El estudio del sistema DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP, presenta termogramas asimétricos, de tal manera que se realizó la deconvolución en cada uno de ellos. Los parámetros termodinámicos para estos sistemas se encuentran en la tabla 5.2.3.

Al comparar los sistemas de DSPC y DSPC-IBU, la adición de ibuprofeno en el fosfolípido puro, provoca un aumento de $T_{1/2}$, de 0.86 a 2.63, es decir, amplía en intervalo de la transición de fase gel a cristal líquido. Por otra parte, los valores de la entropía, entalpía y la T_m del proceso de transición disminuyen en DSPC-IBU. El ibuprofeno modifica la cooperatividad molecular en la membrana, ya que el grupo carboxilo del ibuprofeno puede interactuar con las cabezas polares de los grupos fosfato y amina; con ello se evita la repulsión electrostática entre fosfolípidos [24]. Así también, el ibuprofeno inserta el anillo aromático y el grupo secbutilo entre las cadenas de acilo, el beneficio que se obtiene es un mejor empaquetamiento de los fosfolípidos y la disminución de su movimiento lateral [23], por tal razón se puede hablar de que el ibuprofeno modifica ligeramente la cooperatividad, ya que se disminuye la entropía y la inversión en energía es menor para llevar a cabo la transición de fase gel-líquido cristalino.

El sistema DSPC-IBU-OGP formado por ITC disminuye la T_m de 52.09 °C a 46.03 °C con respecto al DSPC-IBU, es decir se produce inestabilidad térmica debido a la presencia del tensoactivo OGP. La entropía y entalpía del sistema aumentan, por lo tanto, para lograr la transición de fase gel-líquido cristalino, se utiliza mayor energía, en este caso. El aumento de $T_{1/2}$ indica que la cooperatividad de la transición de fase disminuye.

En la gráfica 5.2.3, el termograma del sistema DSPC-IBU es asimétrico, pero no presenta más de una transición de fase, con ello, se puede plantear que el ibuprofeno se distribuye homogéneamente en la membrana lipídica (Figura 5.2.3). En el sistema DSPC-IBU-OGP se muestra asimetría y la amplitud del pico es mayor, por lo cual se realizó la deconvolución del termograma para obtener las contribuciones termodinámicas en la transición.

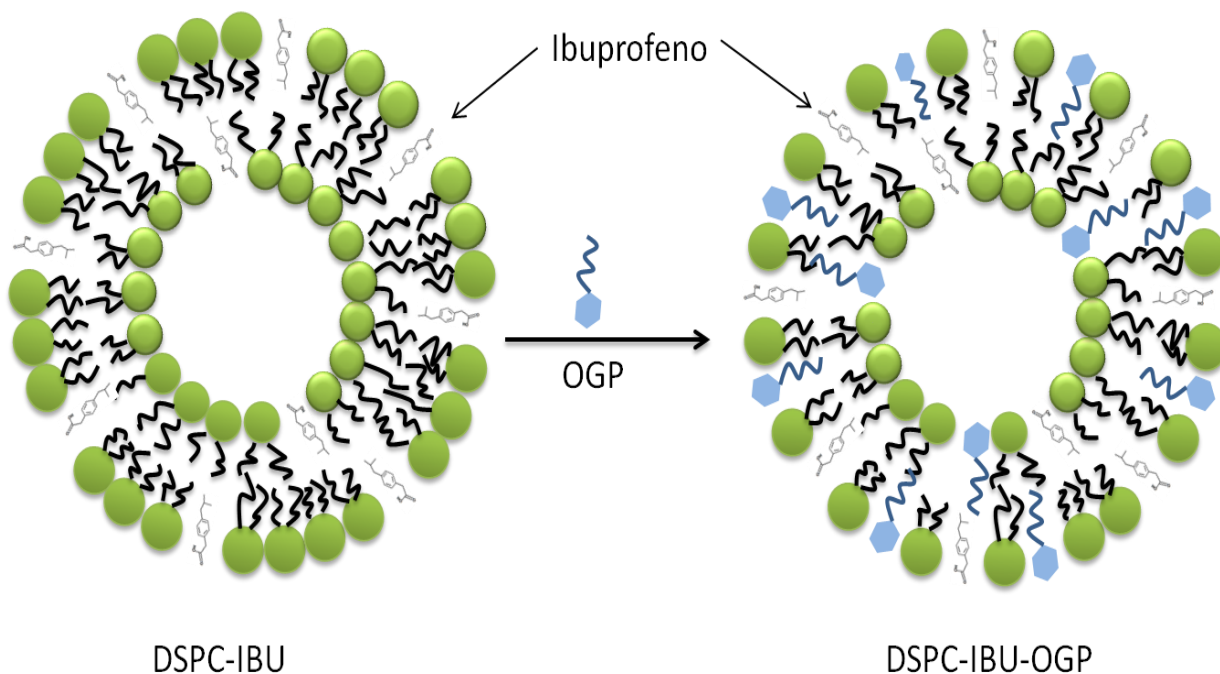
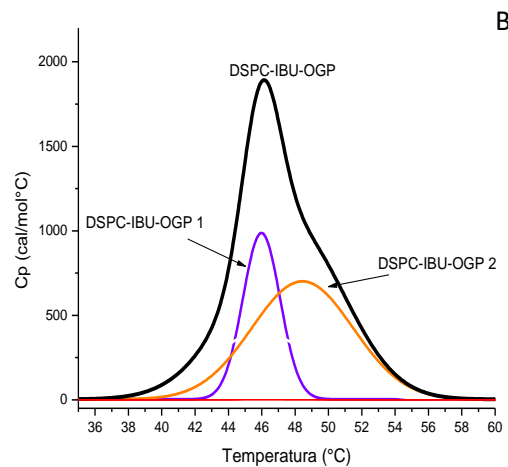
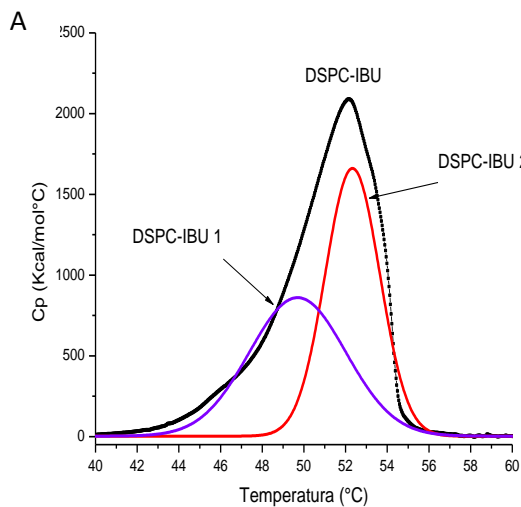
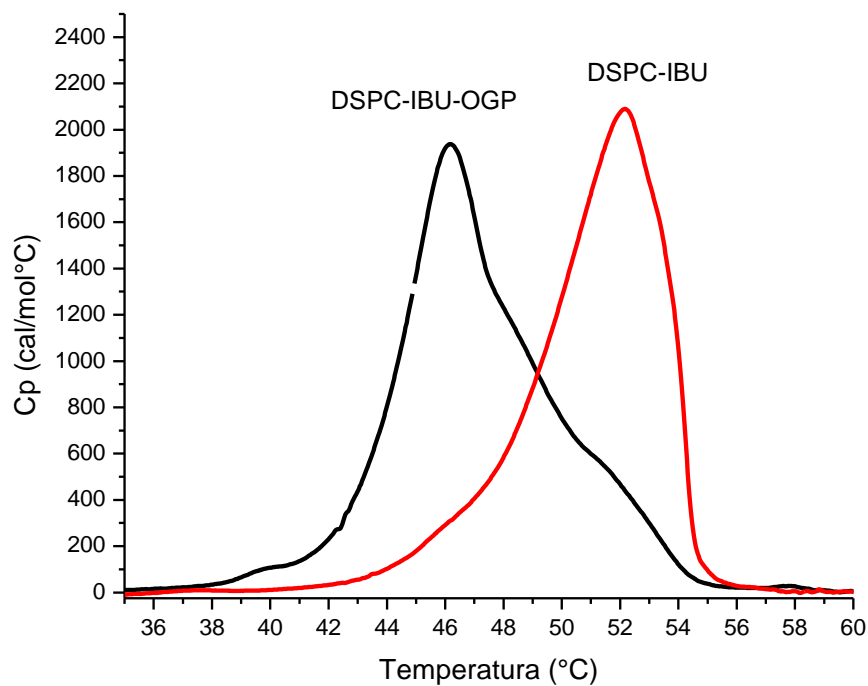


Figura 5.2.3. Representación de una posible distribución homogénea del ibuprofeno y el tensoactivo OGP en la bicapa del liposoma.

Tabla 5.2.3. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC de los sistemas DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP.

Sistema	T_m (°C)	$T_{1/2}$	ΔH (kcalmol ⁻¹)	ΔS (calmol ⁻¹ K ⁻¹)
DSPC-IBU	52.09 ± 0.007	2.63 ± 0.09	10.03 ± 0.44	30.84 ± 0.28
	45.98	2.23	2.75	
	45.98	6.47	3.18	
	48.44	6.06	5.30	
DSPC-IBU-OGP	46.03 ± 0.26	4.89 ± 0.40	10.94 ± 0.25	34.28 ± 0.46
	49.69	4.62	4.97	
	52.33	2.61	5.44	



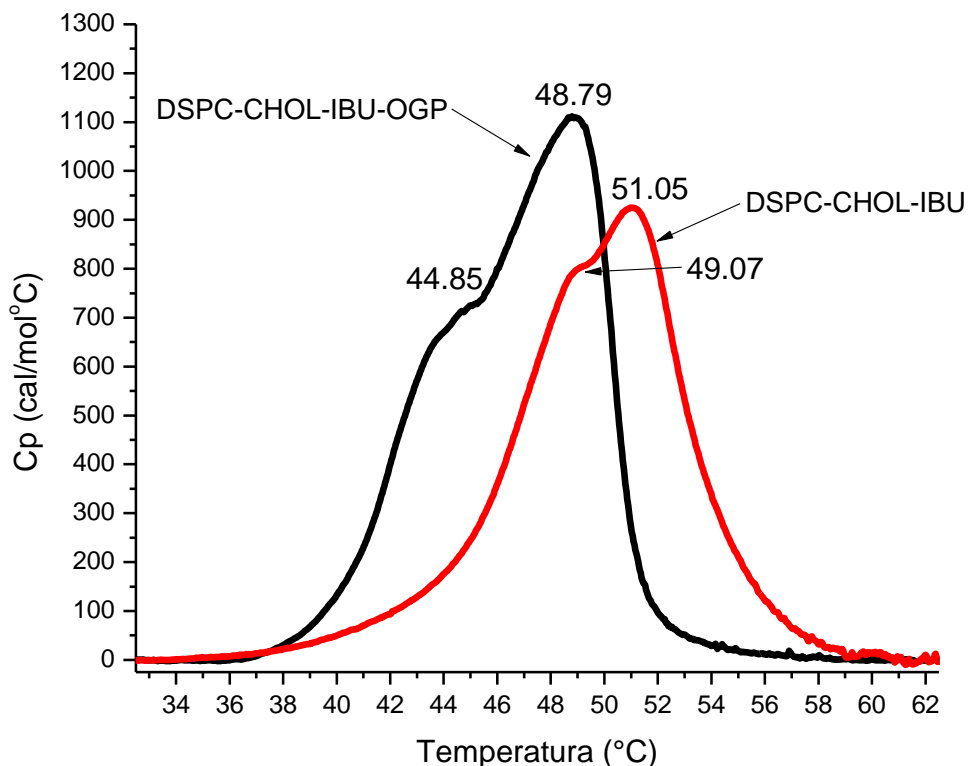
Gráfica 5.2.3. Termogramas de los sistemas DSPC-IBU y DSPC-IBU-OGP, ambos sistemas son asimétricos, pero el sistema DSPC-IBU presenta una contribución endotérmica bajo su T_m , mientras que en el sistema DSPC-IBU-OGP se pueden observar dos contribuciones por arriba de la T_m .

5.2.4 Sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP

El estudio calorimétrico de los sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP por DSC, presenta más de una transición de fase por debajo de la temperatura de transición principal, y se muestran en la gráfica 5.2.4. Por tal razón, en las gráficas 5.2.4.1 y 5.2.4.2 se presenta la deconvolución de ambos sistemas, para obtener los parámetros termodinámicos de cada contribución endotérmica. Los resultados se reportan en la tabla 5.2.4.

Tabla 5.2.4. Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC de los sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP. En cada sistema se tabulan las contribuciones endotérmicas (obtenidas por deconvolución), como DSPC CHOL IBU 1 y 2, también DSPC CHOL IBU OGP 1 y 2.

Sistema	T _m (°C)	T _{1/2}	ΔH (kcalmol ⁻¹)	ΔS (calmol ⁻¹ K ⁻¹)
DSPC-CHOL-IBU	51.05 ± 0.02	6.62 ± 0.07	6.76 ± 0.27	20.85 ± 0.14
DSPC CHOL IBU 1	50.54	5.16	5.083	15.70
DSPC CHOL IBU 2	46.89	7.32	1.386	4.33
DSPC-CHOL-IBU-OGP	48.79 ± 0.40	7.54 ± 0.09	8.05 ± 0.32	25.00 ± 0.19
DSPC CHOL IBU OGP 1	48.96	2.57	2.55	7.92
DSPC CHOL IBU OGP 2	45.32	5.74	5.42	17.02



Gráfica 5.2.4. Termograma de los sistemas DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP. El sistema DSPC-CHOL-IBU se presenta una transición de fase a 49.07 °C y otra a 51.05 °C y para el sistema DSPC-CHOL-IBU-OGP a 44.85 °C y 48.79 °C.

La presencia de dos transiciones nos proporciona información de una distribución aleatoria del colesterol e ibuprofeno dentro de la membrana. La contribución endotérmica a 49.07 °C se atribuye a una región en la bicapa con mayor proporción de colesterol, mientras que la Tm a 50.05 °C a una región de la membrana con mayor proporción de ibuprofeno. La relación de colesterol e ibuprofeno con la Tm correspondiente, se asigna considerando los resultados previos de los parámetros termodinámicos de cada componente, cuando se encuentra con el fosfolípido DSPC. La tabla 5.2.4.1 muestra cómo se modifican los parámetros termodinámicos entre sistemas de forma cualitativa.

Tabla 5.2.4.1. Variación de los parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales con la adición de ibuprofeno y colesterol en el fosfolípido DSPC. Véanse los gráficos 5.2.4.3 y 5.2.4.4 y tabla 5.2.4.3.

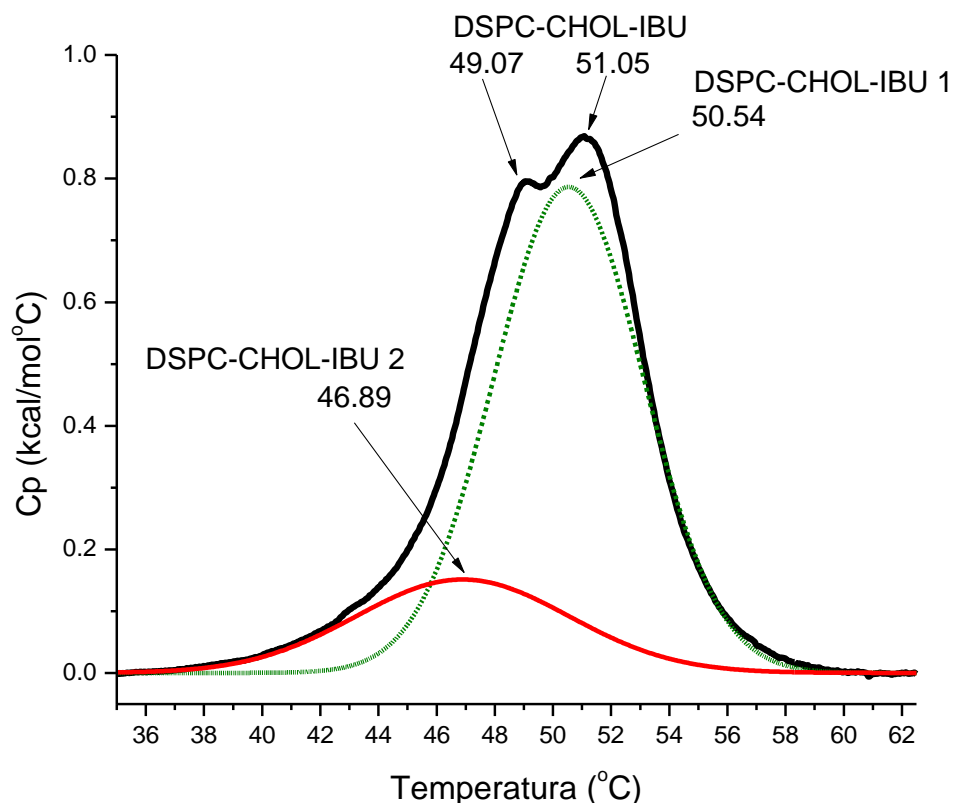
Parámetro	Relación entre sistemas
T_m	DSPC > DSPC-IBU > DSPC-CHOL > DSPC-IBU-CHOL
$T_{1/2}$	DSPC < DSPC-IBU < DSPC-CHOL < DSPC-IBU-CHOL
ΔH	DSPC > DSPC-IBU > DSPC-IBU-CHOL > DSPC-CHOL

En la tabla 5.2.4,1, se indica que la T_m y el ΔH del sistema DSPC-IBU presentan mayor magnitud que para el sistema DSPC-CHOL (tabla 5.2.4.3). Por otra parte, la adición de colesterol afecta más al sistema DSPC que el ibuprofeno al fosfolípido puro (DSPC). Con base a los resultados anteriores, los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos por deconvolución, de cada contribución a 46.9 °C (DSPC CHOL IBU 2) y a 50.54 °C (DSPC CHOL IBU 1), presentan la misma relación, tal como se muestra en la tabla 5.2.4 y en la gráfica 5.2.4.1

Tabla 5.2.4.2. Relación cualitativa de los parámetros termodinámicos obtenidos por el proceso de deconvolución de las dos contribuciones endotérmicas del sistema DSPC.CHOL-IBU.

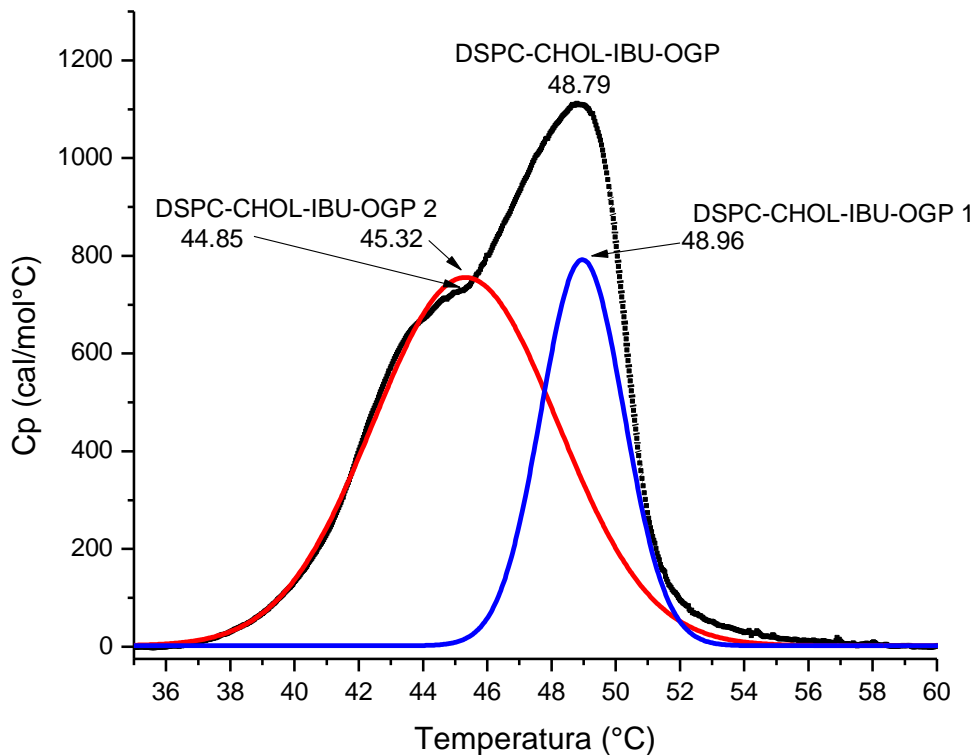
Parámetro	Relación entre deconvoluciones o contribuciones endotérmicas
T_m	DSPC CHOL IBU 1 > DSPC CHOL IBU 2
$T_{1/2}$	DSPC CHOL IBU 1 < DSPC CHOL IBU 2
ΔH	DSPC CHOL IBU 1 > DSPC CHOL IBU 2

La tabla anterior muestra la relación cualitativa entre los parámetros termodinámicos de las dos contribuciones endotérmicas. DSPC-CHOL-IBU 1 es una zona en la bicapa con mayor contenido de ibuprofeno mientras que DSPC-CHOL-IBU 2 representa una zona con mayor proporción de colesterol. La tabla 5.2.4.2. reporta los valores numéricos obtenidos para las dos contribuciones mediante el proceso de deconvolución.



Gráfica 5.2.4.1. Deconvolución del termograma del sistema DSPC-CHOL-IBU, en el cual se muestran las dos principales contribuciones endotérmicas de este sistema, DSPC-CHOL-IBU 1 y DSPC-CHOL-IBU 2.

El sistema DSPC-CHOL-IBU-OGP mantiene dos transiciones de fase, a 44.85 °C y 48.79 °C (gráfica 5.2.4.2), que pueden ser atribuidas a una distribución no homogénea del tensoactivo OGP en el sistema DSPC-CHOL-IBU. Al considerar experimentos anteriores, el termograma del sistema DSPC-CHOL-OGP, muestra dos transiciones de fase (gráfica 5.2.2.), debidas posiblemente a una distribución no homogénea del OGP en la bicapa. Por otra parte, en el sistema DSPC-IBU al combinarlo con el OGP, genera un termograma asimétrico (Gráfica 5.2.3.), que aparentemente sólo presenta una transición de fase, por lo que se propone que el tensoactivo se distribuye con una tendencia homogénea en la bicapa lipídica. Con base a las suposiciones anteriores. Hasta ahora hemos considerado que la presencia de más de una transición de fase se debe a una distribución aleatoria de componentes diferentes a los fosfolípidos, y que esto se manifiesta en una asimetría y/o la aparición de hombros en el termograma. Por lo tanto el tensoactivo OGP se distribuye en la bicapa del sistema DSPC-CHOL-IBU, colocándose preferentemente en una región rica en fosfolípido y/o ibuprofeno.



Gráfica 5.2.4.2. Termograma del sistema DSPC-CHOL-IBU-OGP. Las gráficas DSPC-CHOL-IBU-OGP 1 y DSPC-CHOL-IBU-OGP 2 representan las dos contribuciones endotérmicas del sistema.

El termograma de la gráfica 5.2.4.2 donde se realiza la deconvolución de las dos contribuciones endotérmicas del sistema DSPC-CHOL-IBU-OGP a 48.96 °C y 45.32 °C, por la partición del tensoactivo OGP, y que, a su vez, dependen de la proporción de colesterol e ibuprofeno en la membrana del liposoma. La transición de fase de DSPC-CHOL-IBU-OGP 2 a 45.32 °C se atribuye a una zona con mayor proporción de ibuprofeno, en el cual el OGP tiende a distribuirse de una manera más homogénea, de tal manera que modifica ampliamente los parámetros termodinámicos, tal como, la disminución de la T_m y aumento de la ΔH y el ΔS . La contribución endotérmica de DSPC-CHOL-IBU-OGP 1, a 48.96 °C, se atribuye a una zona en la bicapa con mayor contenido de colesterol, ya que aumenta el carácter hidrofóbico en la membrana y contribuye a un mejor empaquetamiento de los fosfolípidos, por tal razón, la T_m , el ΔH y la ΔS disminuyen, pero esta disminución es menor comparada con la de los otros sistemas. La relación cualitativa del cambio en los parámetros termodinámicos cuando se adiciona OGP se muestra en la tabla 5.2.4.2 y de forma cuantitativa en la tabla 5.2.4.3.

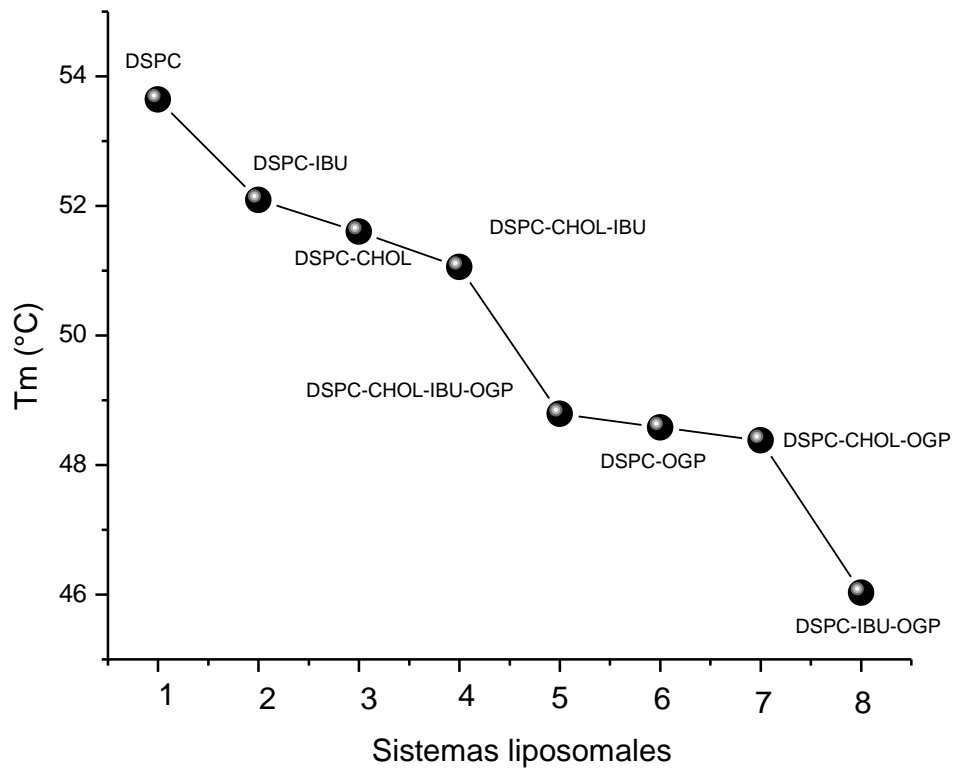
Tabla 5.2.4.2. Relación cualitativa, cómo varían de los parámetros termodinámicos de los diferentes sistemas liposomales, cuando se adiciona el tensoactivo no iónico OGP. Aquí se consideran los parámetros con respecto a la temperatura de transición principal.

Parámetro	Relación entre sistemas
T_m	DSPC-OGP > DSPC-CHOL-OGP > DSPC-IBU-CHOL-OGP > DSPC-IBU-OGP
T_{1/2}	DSPC-OGP < DSPC-IBU-OGP < DSPC-CHOL-OGP < DSPC-IBU-CHOL-OGP
ΔH	DSPC-OGP > DSPC-IBU-OGP > DSPC-IBU-CHOL-OGP > DSPC-CHOL-OGP

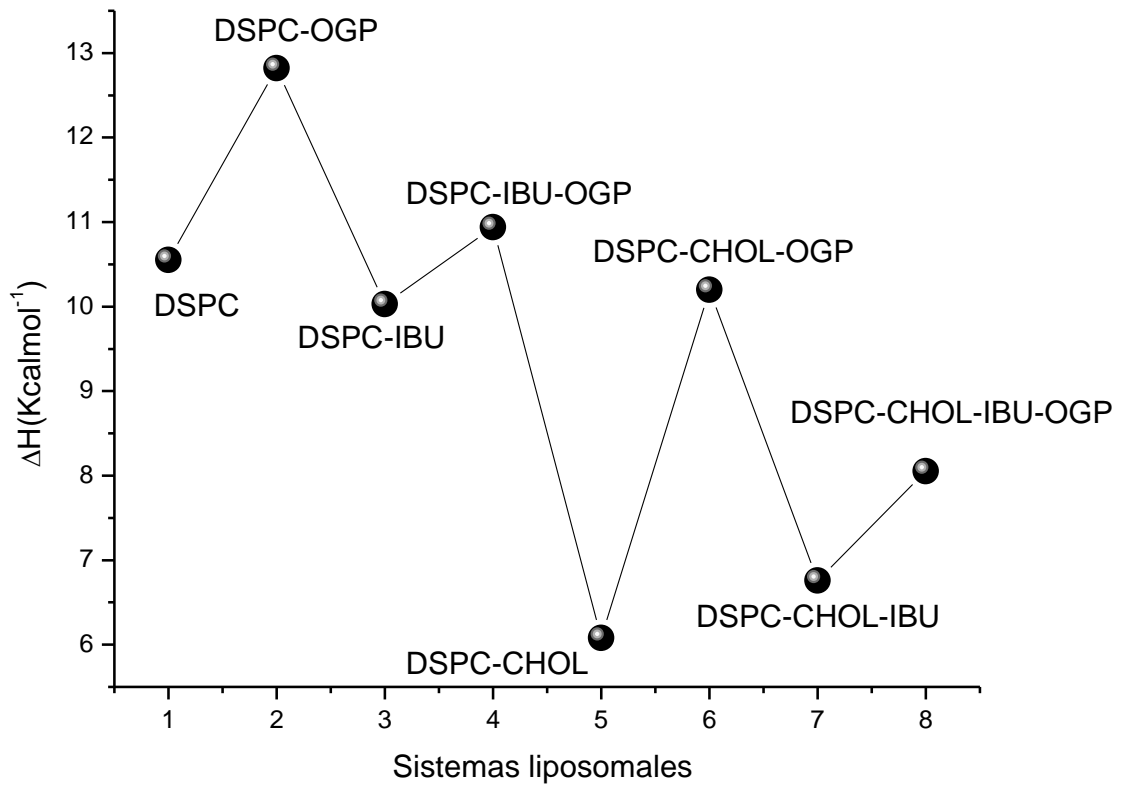
5.2.4.3. Resumen de resultados del estudio por calorimetría diferencial de barrido de los sistemas liposomales

Tabla 5.2.4.3. Parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales antes y después de la titulación con el tensoactivo OGP. Los parámetros corresponden a la transición de fase principal, para los sistemas en donde se presenta más de una transición de fase.

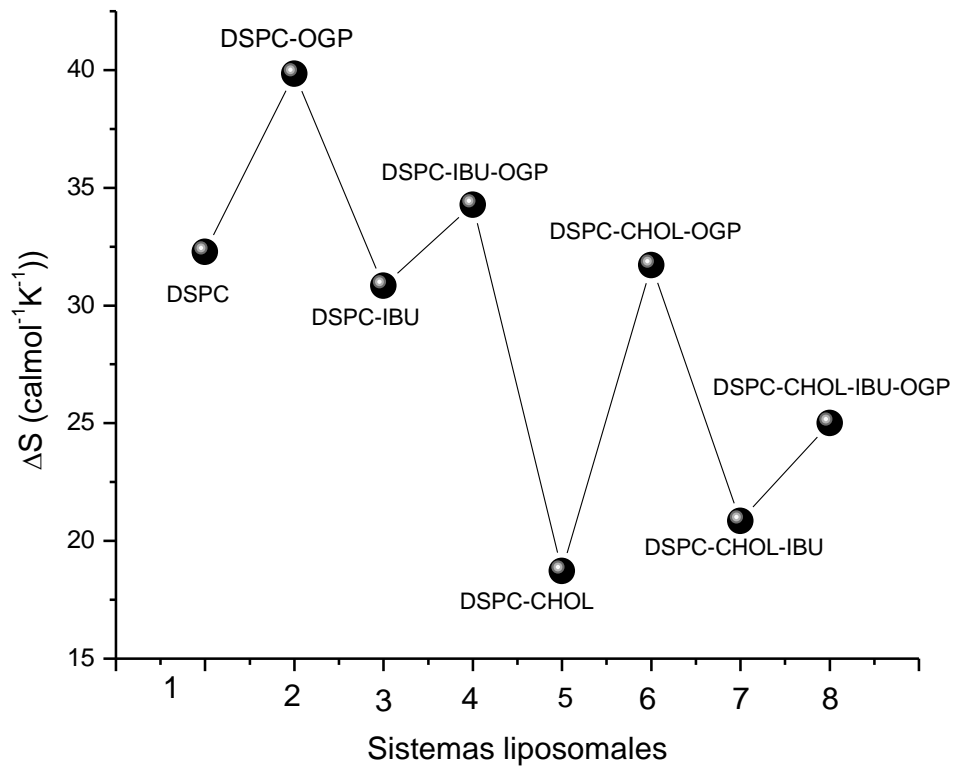
	T_m(°C)	T_{1/2}	ΔH (kcalmol⁻¹)	ΔS (calmol⁻¹K⁻¹)
DSPC	53.64 ± 0.18	0.86 ± 0.01	10.55 ± 0.17	32.28 ± 0.04
DSPC-OGP	48.58 ± 0.04	2.60 ± 0.04	12.82 ± 0.60	39.84 ± 0.4
DSPC-IBU	52.09 ± 0.01	2.63 ± 0.09	10.03 ± 0.44	30.84 ± 0.28
DSPC-IBU-OGP	46.03 ± 0.26	4.89 ± 0.40	10.94±/-0.25	34.27 ± 0.46
DSPC-CHOL	51.60 ± 0.16	4.52 ± 0.43	6.08 ± 0.18	18.72 ± 0.46
DSPC-HOL-OGP	48.38 ± 0.20	6.9 ± 0.05	10.20 ± 0.22	31.72 ± 0.1
DSPC-CHOL-IBU	51.054 ± 0.02	6.62 ± 0.07	6.76 ± 0.27	20.85 ± 0.14
DSPC-CHOL-IBU-OGP	48.79 ± 0.04	7.54 ± 0.09	8.05 ± 0.32	25.00 ± 0.19



Gráfica 5.2.4.3. Variación de la T_m de transición de fase gel a cristal líquido cuando en la bicapa lipídica del sistema DSPC cuando se integran moléculas hidrofóbicas como el ibuprofeno y el colesterol, así como el tensoactivo no iónico OGP.



Gráfica 5.2.4.4. Variación de la entalpía de la transición de fase gel a cristal líquido cuando en la bicapa lipídica del sistema DSPC se integran moléculas tal como el ibuprofeno y el colesterol, así como el tensoactivo no iónico OGP.



Gráfica 5.2.4.5. Variación de la entropía de la transición de fase gel a cristal líquido cuando en la bicapa lipídica del sistema DSPC se integran moléculas tal como el ibuprofeno y el colesterol, así como el tensoactivo no iónico OGP.

5.3 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

5.3.1 Resultados ITC de la titulación de los sistemas DSPC, DSPC-CHOL, DSPC-IBU y DSPC-CHOL-IBU.

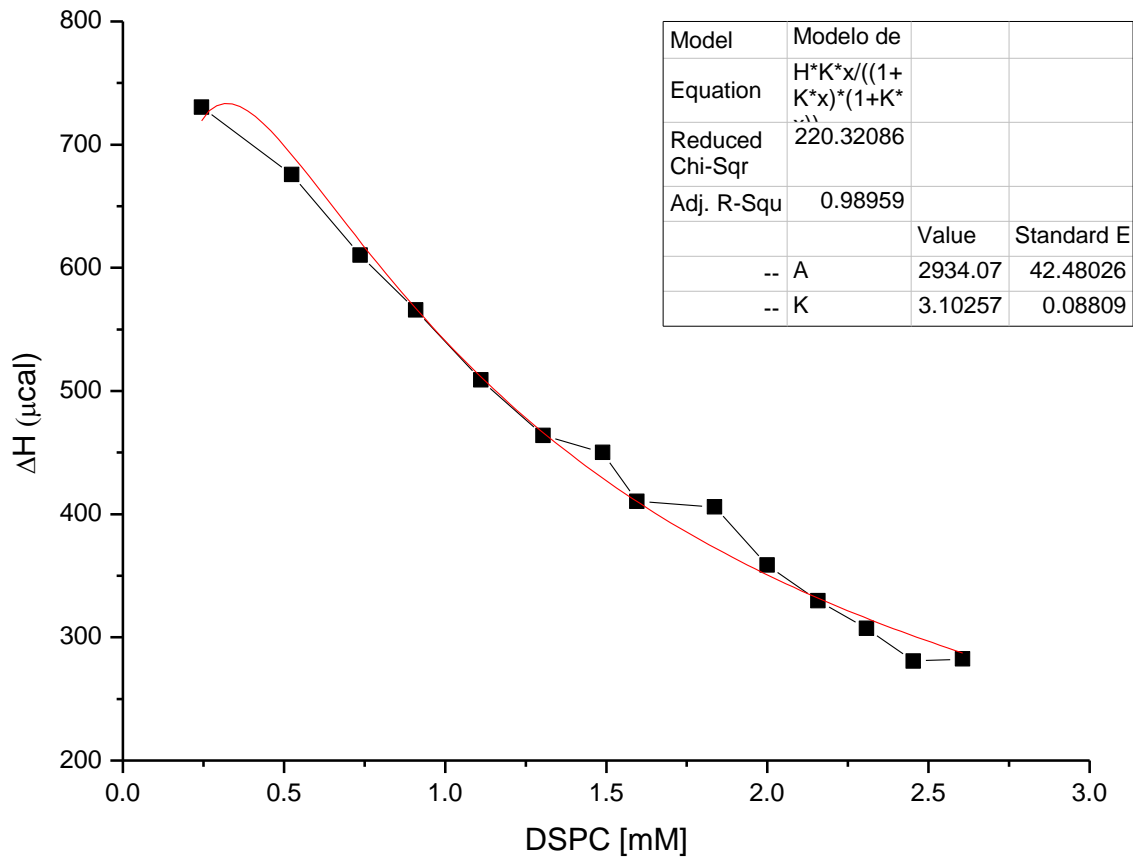
La titulación de los sistemas liposomales DSPC, DSPC-CHOL; DSPC-IBU y DSPC-CHOL-IBU se realizó en una solución del tensoactivo no iónico OGP [15mM], es decir por debajo de su CMC. Los parámetros termodinámicos obtenidos por ITC ajustando el modelo de Lichtenberg y que se muestran en la tabla 5.3, indican que el proceso de partición del OGP en la bicapa de los sistemas liposomales, es espontáneo ($\Delta G < 0$). Por otra parte, el valor del ΔH es positivo y es menor comparado con el valor positivo correspondiente a la $T\Delta S$, eso nos indica que el proceso está guiado principalmente por la entropía debido al efecto hidrofóbico.

Los sistemas DSPC y DSPC-CHOL al ser adicionados a la celda que contiene el tensoactivo OGP, producen un calor de reacción endotérmica y que decrece continuamente con la posterior inyección, y se muestran en la gráfica (5.3.0 y 5.3.1). El valor de la constante de partición, es mayor para el sistema DSPC, que para el sistema DSPC-CHOL y es debido a la presencia del colesterol en la bicapa, ya que introduce en la membrana disminuyendo la permeabilidad de la misma [3].

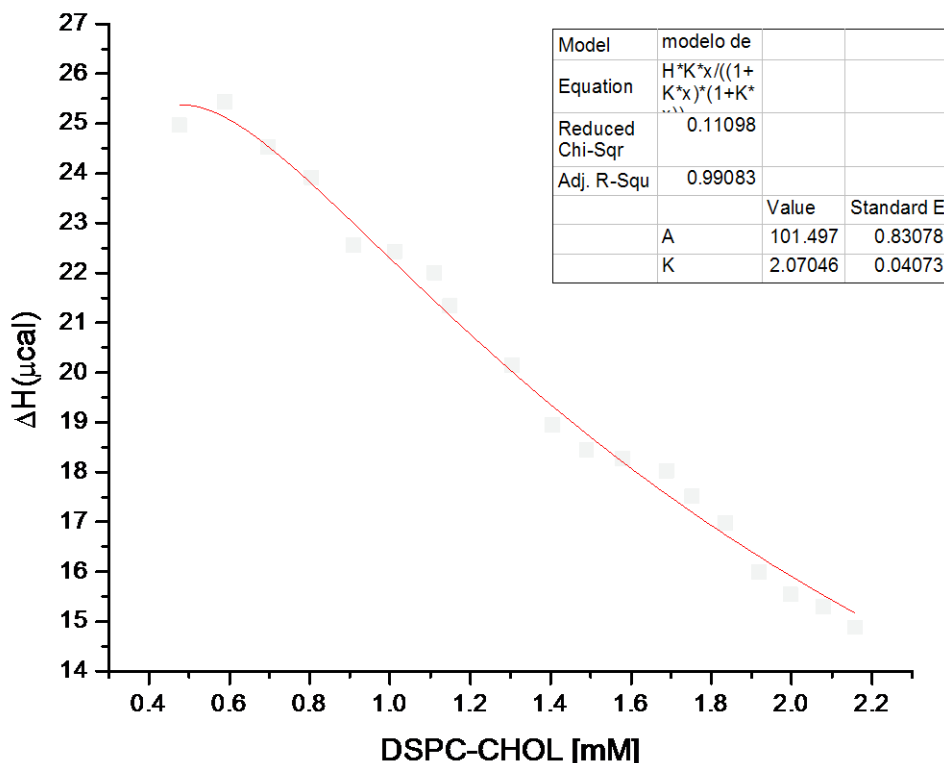
Los parámetros obtenidos para estos sistemas indican que el tensoactivo OGP se distribuye mayoritariamente en el fosfolípido puro DSPC, y se requiere mayor energía para insertar el tensoactivo en la bicapa, en comparación con el sistema DSPC-CHOL, tal como lo indica el valor de la entalpía del proceso de partición.

Tabla 5.3. Muestra los parámetros obtenidos por ITC mediante el ajuste con el modelo de Lichtenberg. **K** representa la constante de partición del tensoactivo OGP en cada sistema de vesículas mixtas. El **ΔH** , la **ΔG** y la **$T\Delta S$** representan la entalpía, la energía libre de Gibbs y la entropía multiplicada por la temperatura, del proceso de partición del tensoactivo OGP.

Sistema	K (mM ⁻¹)	ΔH (cal/mol)	ΔG (cal/mol)	$T\Delta S$ (cal/mol)
DSPC-OGP	2.91	177.17	-632.80	809.97
DSPC-CHOL-OGP	2.07	6.34	-431.02	437.36
DSPC-IBU-OGP	1.09	153.53	-51.05	204.58
DSPC-CHOL-CHOL-OGP	2.30	30.63	-493.44	524.06



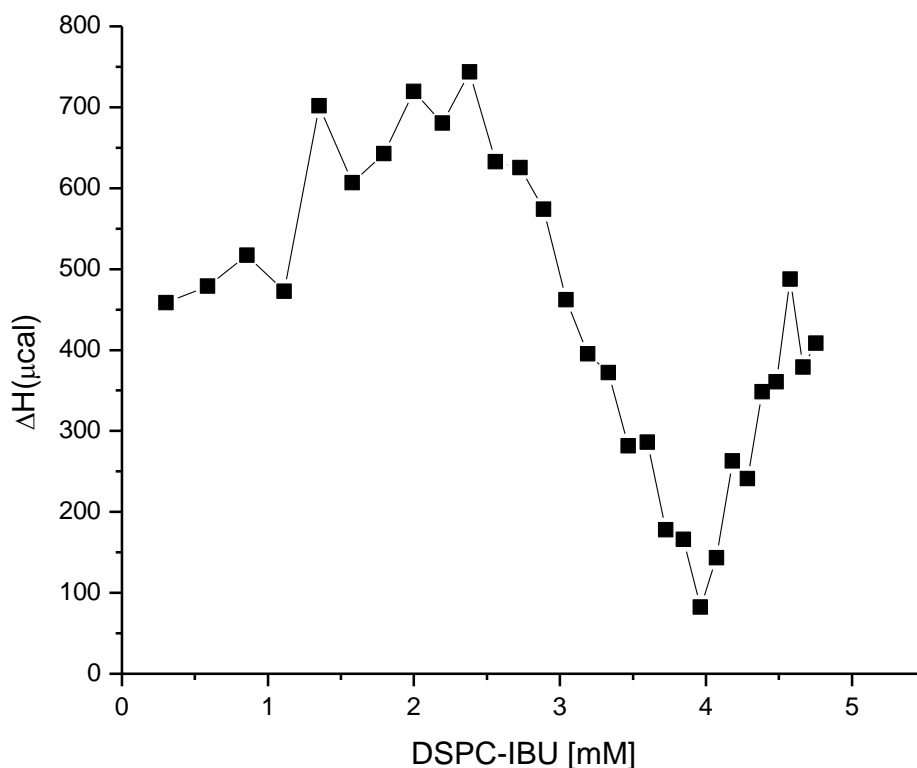
Gráfica 5.3. Termograma de la titulación del sistema DSPC [10mM] en una solución de OGP [15mM]. Se muestra cómo al adicionar 50 μ l de la suspensión de vesículas de DSPC a la solución de OGP, se produce un calor de reacción endotérmico y que disminuye con la inyección consecutiva de la suspensión.



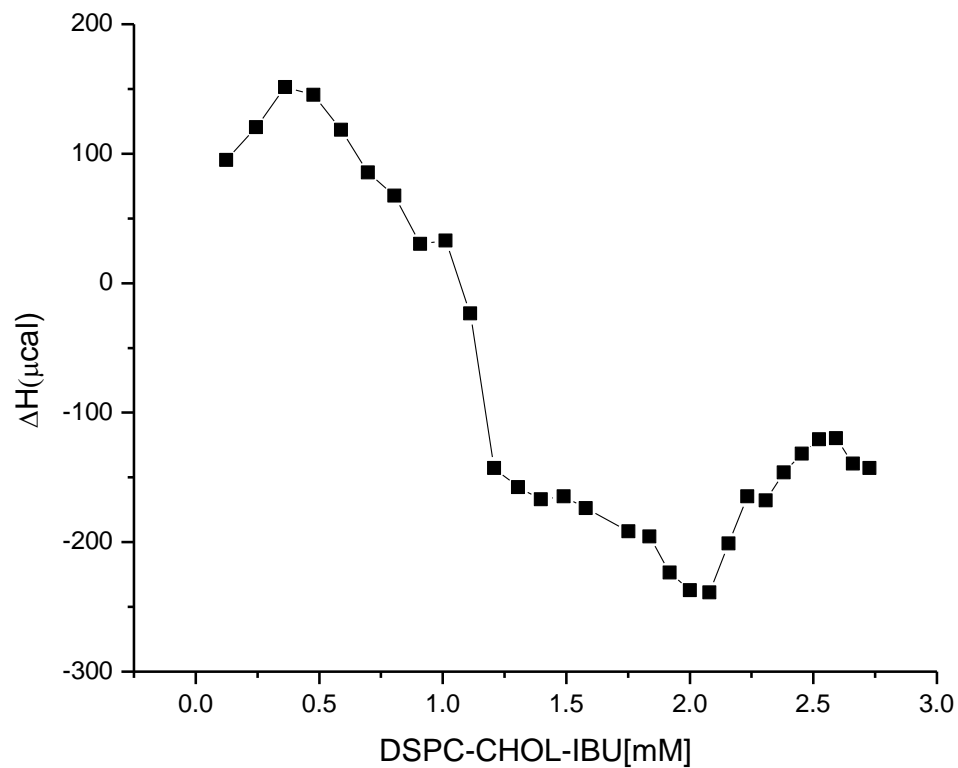
Grafica 5.3.1. Termograma de la titulación del sistema DSPC-CHOL a una proporción molar (4:1) en una solución de OGP [15mM]. Se muestra cómo al adicionar 50 μ l de la suspensión de vesículas de DSPC-CHOL a la solución de OGP, se produce un calor de reacción endotérmico y que disminuye con la inyección consecutiva de la suspensión.

Durante el experimento de ITC la partición del tensoactivo produce calores de reacción endotérmicas, y disminuyen con la consecuente inyección de la suspensión del sistema DSPC y DSPC-CHOL, sin embargo, cuando se agrega el ibuprofeno a los sistemas, se presenta un patrón de titulación más complejo, en donde se presentan reacciones endotérmicas y exotérmicas en los sistemas DSPC-IBU-OGP (Gráfica 5.3.2) y DSPC-CHOL-IBU-OGP (Gráfica 5.3.3) y que no puede describirse con el modelo de partición de Lichtemberg, ya que probablemente se presentan equilibrios simultáneos y/o diferentes tipos de interacciones, entre las diferentes moléculas presentes y que de ello depende la energía involucrada para la inserción o partición del tensoactivo OGP en la membrana. De acuerdo con los datos de los termogramas obtenidos por DSC para

los sistemas liposomales DSPC-IBU, DSPC-IBU-OGP, DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP, se observa asimetría y la presencia de hombros respectivamente, debido a una distribución no aleatoria del colesterol e ibuprofeno así como del OGP en los diferentes dominios de ibuprofeno y colesterol en la bicapa lipídica de los sistemas liposomales.



Gráfica 5.3.2. Termograma de la titulación del sistema DSPC-IBU a una proporción molar (4:1) en una solución de OGP [15mM]. Se muestra cómo al adicionar 50 μ l de la suspensión de vesículas de DSPC-IBU a la solución de OGP, se produce un patrón de titulación más complejo con respecto al sistema DSPC.



Gráfica 5.3.3. Termograma de la titulación del sistema DSPC-CHOL-IBU a una proporción molar (8:1:1.7:1) en una solución de OGP [15mM]. Se muestra cómo al adicionar 50μl de la suspensión de vesículas a la solución de OGP, se produce un patrón de titulación más complejo con respecto al sistema DSPC y DSPC-CHOL.

Conclusiones

- La adición de ibuprofeno, colesterol y OGP en la membrana lipídica de DSPC, provocan una ampliación del intervalo de la transición ($T_{1/2}$) de fase gel a líquido cristalino, indicativo de una disminución de la cooperatividad molecular de las moléculas del fosfolípido.
- La incorporación de colesterol e ibuprofeno en las bicapas lipídicas de DSPC inducen que la entalpía, entropía y la T_m de la transición de fase disminuyan, debido a que influyen al ordenamiento de las cadenas hidrofóbicas. Por el contrario, la incorporación del tensoactivo OGP en todos los sistemas liposomales, provoca que se invierta más energía para llevar a cabo la transición de fase, probablemente a un aumento en el número de interacciones entre grupos OH del tensoactivo.
- La traza calorimétrica de la técnica DSC, en los sistemas DSPC-CHOL-OGP, DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP se presenta más de una transición de fase, posiblemente a una distribución no homogénea del colesterol, ibuprofeno (formación de dominios) y OGP en la membrana lipídica.
- Los sistemas DSPC y DSPC-OGP presentan la mayor capacidad de permanecer en suspensión, principalmente debido a que tienen un tamaño de partícula alrededor de 100 nm y un potencial Zeta mayor a cero, lo cual permite mayor movimiento browniano y repulsión de liposomas adyacentes entre sí respectivamente. Los sistemas que contienen colesterol presentan un tamaño de partícula que no varía en gran magnitud durante el tiempo de monitoreo, debido a que el colesterol tiende a aumentar el carácter hidrofóbico en la membrana y con ello, la disminución de la permeabilidad a moléculas solubles en medio acuoso, que puedan modificar el tamaño hidrodinámico.
- La formación de las vesículas mixtas mediante la incorporación del tensoactivo OGP, es un proceso espontáneo guiado principalmente por la entropía. La constante de partición es menor en los sistemas que contienen colesterol con respecto al fosfolípido puro DSPC, a pesar de que la incorporación del colesterol y OGP disminuyen el potencial Z, los liposomas logran permanecer en suspensión debido a un tamaño de partícula cercano a 100 nm y al movimiento browniano. En cambio, cuando se adiciona el ibuprofeno al DSPC y posteriormente el OGP, el potencial Z disminuye a un valor cercano a cero, por tal razón la fuerza de atracción entre liposomas es mayor, de tal manera que los liposomas presentaron separación de fase al inicio de las 24 horas de monitoreo de la estabilidad.
- Las microscopías electrónicas de barrido muestran cómo los liposomas presentan una morfología esférica, así como la capacidad de formar aglomerados, por medio de microscopía de transmisión se puede notar que el tamaño de los liposomas obtenido se relaciona con el obtenido por DLS.

- La encapsulación de ibuprofeno en el fosfolípido DSPC es más estable cuando el sistema contiene colesterol ya que permite mejorar el tiempo en la permanencia en suspensión y en el tamaño hidrodinámico, mientras que al adicionar el tensoactivo OGP, facilita una mayor resuspensión, por tal razón la simulación de una célula como los liposomas mixtos mejora la capacidad de disolver fármacos hidrofóbicos y mejorar el tiempo de estabilidad.

Perspectivas

Realizar estudios de liberación para determinar el porcentaje de encapsulación de ibuprofeno en el sistema DSPC-CHOL-IBU y DSPC-CHOL-IBU-OGP.

Referencias

- 1 Jain K. K.; Ajit S. Narang. Editors; Drug Delivery Systems. Human press (2008) Basel Zwitterland.
- 2 Shashi, K.; Satinder, K.; Bharat, P. A complete review on: liposomes International Research Journal of pharmacy (2012) 3, 10-16.
- 3 Mozhgan Nazari. Properties of surfactants that govern their functions and applications on lipid membranes. PhD thesis. University of Toronto 2012.
- 4 Todd P. W. McMullen, Ruthven N. A. H. Lewis, and Ronald N. McElhaney. Differential Scanning Calorimetric Study of the Effect of Cholesterol on the Thermotropic Phase Behavior of a Homologous Series of Linear Saturated Phosphatidylcholines. Biochemistry, 32(1993) 516-522.
- 5 Ram I. Mahato. Editors. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery. First edition (2007).
- 6 Villegas Pineda Cecilia Ximena. Tesis que para obtener el título de Doctora en Ingeniería. Estudio de las interacciones entre el octil- β -D-glucopiranosido y el biopolímero Hidroxietil-celulosa. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química (2016).
- 7 Urbano S. Oldais. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Caracterización fisicoquímica de la conversión de vesículas de L-alfa-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) a micelas mixtas mediante la adición de n-octil-beta-D-glucopiranosido. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química (2014).
- 8 Henning, L.; Grete, M.; Holm, H. interaction of ibuprofen membrane lipids. Odontol Scand 2003;61:303-309
- 9 Rang, H.P.; Dale M. M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson G. Editors. Farmacología. Séptima edición. Press 2012 Barcelona España.
- 10 Ruano Aldea Marta. Tesis para obtener el grado de Doctor. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Física I Madrid 2013.
- 11 Gregoria G. Editor. Liposome technology, preparation and related techniques volume 1. Third edition. Printed (2007) United States of America.
- 12 Martinez Galicia C. J. Caracterización fisicoquímica de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de liposomas de l-alfa-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) y n-nonil-beta-D-glucopiranosido (OGP). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

- (2016).
- 13 R. Wenk and Joachim Seelig. Vesicle-Micelle Transformation of Phosphatidylcholine/ Octyl- β -D-glucopyranoside Mixtures as Detected with Titration Calorimetry. *J. Phys. Chem. B* (1997), 101, 5225-5231
 - 14 H. Heerklotz and J. Seelig. Correlation of Membrane/Water Partition Coefficients of Detergents with the Critical Micelle Concentration. *Biophysical Journal* Volume 78 May 2000 2435–2440.
 - 15 Torchillin, V.P.; Weissig, V. Editors. *Liposomes*. Second edition. Oxford University press (2007) New York.
 - 16 H. Heerklotz, J. Seelig. Titration calorimetry of surfactant membrane partitioning and membrane solubilization.. *Biochemical et Biophysica Acta* 1508 (2000) 69-85
 - 17 M.A. Soto-Arriaza, C. Olivares-Ortega, F.H. Quina, L.F. Aguilar, C.P. Sotomayor. Effect of cholesterol content on the structural and dynamic membrane properties of DMPC/DSPC large unilamellar bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828 (2013) 2763-2769.
 - 18 Nicomp 380 DLS User Manual Particle Sizing Systems, Inc.
 - 19 Nicomp 380 Zeta Potential User Manual systems, Inc.
 - 20 Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes
 - 21 Patrick J. Sinko, Wolter kluwer.Editors Martin´s physical pharmacy and pharmaceutical sciences. Sixth edition. Printed (2011) China Hong kong.
 - 22 Avdeef A. Editor. *Absorption and drug development solubility permeability, and charge state*. (2003) United States of America.
 - 23 Aboozar Khajeh, Hamid Modarress. The influence of cholesterol on interactions and dynamic of ibuprofen in a lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838 (2014) 2431–2438.
 - 24 Liangwei Du, Xiaohua Liu, Weimin Huang, Erkang Wang. A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane. *Electrochimica Acta* 51 (2006) 5754–5760.