



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Caracterización fisicoquímica de la encapsulación de pinocembrina
en liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Elizabeth Uría Canseco

Tutora: Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, Septiembre, 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Caracterización fisicoquímica de la encapsulación de pinocembrina
en liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Elizabeth Uría Canseco

Tutora: Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas
Facultad de Química, UNAM



Ciudad de México, 2020

El presente trabajo fue realizado gracias al financiamiento de:

Facultad de Química, UNAM. Proyecto PAIP 5000-9020

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT. Beca No. 270969

Comité Tutor:

Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas

Dr. Efrén Hernández Baltazar

Dr. David Quintanar Guerrero

Jurado

Presidente: Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Vocal: Dr. Enrique García Hernández

Vocal: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal: Dr. Efrén Hernández Baltazar

Secretaria: Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba

Lugar de Realización:

Laboratorio 102, Biofísicoquímica, Edificio F, Facultad de Química, UNAM

Los resultados de esta investigación se presentaron en:

102nd Canadian Chemistry Conference and Exhibition. Junio, 2019. Québec, Canadá.

Spherical and tubular dimyristoylphosphatidylcholine liposomes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 13, 2019. DOI 10.1007/s10973-019-08416-0

Simultaneous encapsulation of hydrophilic and lipophilic molecules in liposomes of DSPC, *Thermochimica Acta*, vol. 687, 2020. DOI 10.1016/j.tca.2019.178462

He encontrado mucha gente maravillosa en mi camino, de todos ellos aprendí.

GRACIAS:

A los que han hecho posible este trabajo.

A mi comité tutor, Dr. Efrén Hernández y David Quintanar, por su tiempo, su apoyo y por enriquecer la investigación.

A la Dra. Josefa Bernad Bernad y Dr. Ismael Bustos Jaimes por permitirme utilizar el equipo de DLS, por su hospitalidad.

Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo, Q.F.B. Teresa Ballado Nava y Dr. Georges Dreyfus por el uso del extrusor.

Dr. Rafael Ivan Puente Lee de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) quien obtuvo las microscopias que se presentan en este trabajo.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz por recibirme en su laboratorio.

A mis hijas, a quienes quiero mostrarles que todo esfuerzo siempre será recompensado. Ustedes me motivan a ser mejor persona porque el ejemplo vale más que cualquier discurso.

A mi esposo, mi compañero de viaje, mi amigo, el amor de mi vida.

A mi madre por todo lo que me ha apoyado. Mi padre, siempre orgulloso de mí. Mis hermanos, siempre juntos a pesar de todo.

A mi querida Doctora, mi amiga, mi tutora, mi ejemplo. Todo el tiempo compartido ha sido un continuo aprendizaje, he crecido tanto a su lado. Gracias por tanto cariño, es bien correspondida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio.

A Jessica Díaz, por su apoyo en el laboratorio, por el compañerismo y la amistad.

A la UNAM, mi casa, el lugar al que siempre quiero regresar. Orgullosamente puma.

Por mi raza, hablará el espíritu... ¡Goya!

Caracterización fisicoquímica de la
encapsulación de pinocembrina
en liposomas de
dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)

Contenido

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1 Productos Naturales	6
1.2 Propóleo	8
1.2 Flavonoides	9
1.3 Pinocebrina	9
1.4 Liposomas.....	10
1.5 Liposomas en la industria farmacéutica	12
1.6 Caracterización de liposomas	13
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVO GENERAL.....	14
4. OBJETIVOS PARTICULARES	14
5. ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO	15
6. MATERIALES Y REACTIVOS	15
6.1 Obtención de extracto de propóleo y fragmentación	15
6.2 Solubilidad intrínseca y eficiencia de incorporación.....	16
6.3 Preparación de liposomas	16
7. METODOLOGÍA.....	16
7.1 Obtención de Extracto de Propóleo	16
7.2 Obtención de pinocebrina a partir de extracto de propóleo	17
7.3 Caracterización de pinocebrina por RMN.....	21
7.4 Solubilidad intrínseca	23
7.5 Preparación de liposomas	24
8. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS	25
8.1 Calorimetría Diferencial de Barrido	25
8.2 Determinación de tamaño, estabilidad y morfología	25
8.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	25
8.4 Eficiencia de Incorporación	26

9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
9.1	Solubilidad intrínseca de extracto de propóleo	27
9.2	Solubilidad intrínseca de pinocembrina	29
9.3	Transición de fase de los liposomas	32
9.4	Saturación de la membrana lipídica	34
9.5	Porcentaje de encapsulación.....	46
9.6	Tamaño de partícula y estabilidad.....	48
9.7	Microscopía Electrónica	50
9.8	Incorporación de colesterol.....	60
9.9	Liposomas con colesterol en medio amortiguado.....	63
10.	CONCLUSIONES	66
	REFERENCIAS.....	68
	PUBLICACIONES.....	73

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DSPC	diesteroilfosfatidilcolina
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
HSPC	fosfatidilcolina hidrogenada de soya
DSPG	distearoilfosfatidilglicerol
DSC	calorimetría diferencial de barrido
DLS	dispersión dinámica de luz
DOPC	dioleoilfosfatidilcolina
DPPG	dipalmitoilfosfatidilglicerol
EPC	fosfatidilcolina de huevo
HSPC	fosfatidilcolina hidrogenada de soya
DSPE	distearoil-sn-glycero-fosfoetanolamina
PEG	polietilenglicol
DMPG	dimiristoilfosfatidilglicerol
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DOPE	dioleoil-sn-glycero-fosfoetanolamina
PINO	pinocembrina
CH	colesterol
EP	extracto de propóleo
SEM	microscopia electrónica de barrido
RMN	resonancia magnética nuclear
El	eficiencia de incorporación
UC	unidad cooperativa
ACC	concentración crítica del aditivo
PDI	índice de polidispersidad

RESUMEN

La pinocembrina es una molécula de origen natural con un gran potencial como principio activo para el tratamiento de diferentes enfermedades crónicas; entre ellas el cáncer, hemorragia intracerebral, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, etc. [1–4]; sin embargo, su baja solubilidad ha limitado su aplicación. El uso de nanoacarreadores moleculares, por ejemplo, liposomas, es una estrategia novedosa para aumentar la solubilidad, biodisponibilidad y actividad biológica de la molécula activa.

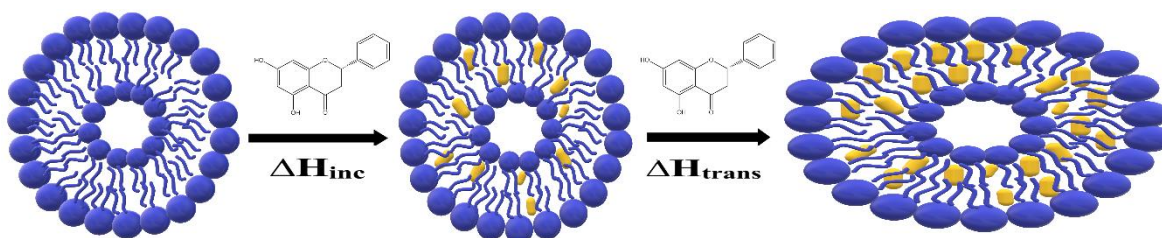
Hasta la fecha no existe una investigación de la interacción de pinocembrina con liposomas. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio fisicoquímico de la incorporación de pinocembrina en liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) para aumentar la solubilidad de esta molécula potencializando su uso como principio activo.

El comportamiento termotrópico de las vesículas antes y después de incorporar los aditivos fue determinado con calorimetría diferencial de barrido.

Las características de las estructuras formadas fueron estudiadas utilizando dispersión dinámica de luz, microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Se prepararon vesículas unilamelares de aproximadamente 100 nm con concentraciones de 0 a 0.940 mg/mL de pinocembrina. Se utilizó agua milli-Q y medio amortiguado de fosfatos pH 7.4 para hidratar los liposomas, la suspensión liposomal fue más estable en PBS. La pinocembrina se incorporó dentro de la membrana lipídica interaccionando fuertemente con los grupos acilo de los fosfolípidos, favoreciendo la fase fluida. La eficiencia de incorporación fue del 89%. A concentraciones de pinocembrina mayores a 0.436 mg/mL se observa un cambio de estructura de liposomas esféricos a tubulares. La adición de colesterol en la formulación no aumentó la estabilidad de la disolución.

Los resultados de este trabajo y otros estudios de pinocembrina con diesteroilfosfatidilcolina (DSPC) fueron publicados en Journal of Thermal Analysis and Calorimetry y Thermochemica Acta, respectivamente [5,6].



1. ANTECEDENTES

1.1 Productos Naturales

Los productos naturales o metabolitos secundarios provenientes de plantas, algas, hongos y diversos microorganismos son una fuente valiosa de posibles principios activos para la industria farmacéutica.

Sin duda, uno de los ejemplos más famosos es la penicilina, proveniente del hongo *Penicillium notatum*, descubierta por Fleming en 1929. En años recientes, probablemente el medicamento más exitoso derivado de un producto natural es el paclitaxel (Taxol®), aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* y aprobado en 1992 por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de cáncer de mama [7].

Newman y Cragg han evaluado los productos naturales como fuente de nuevos fármacos desde 1981 [8]. En su investigación, han encontrado que un alto porcentaje de nuevos agentes terapéuticos son productos naturales o derivados semisintéticos de los mismos (Figura 1). Entre los principales campos de aplicación destaca su uso como agentes antivirales, antibacteriales, analgésicos, antifúngicos, antidiabéticos, antidepresivos, diuréticos, antiinflamatorios y anticancerígenos.

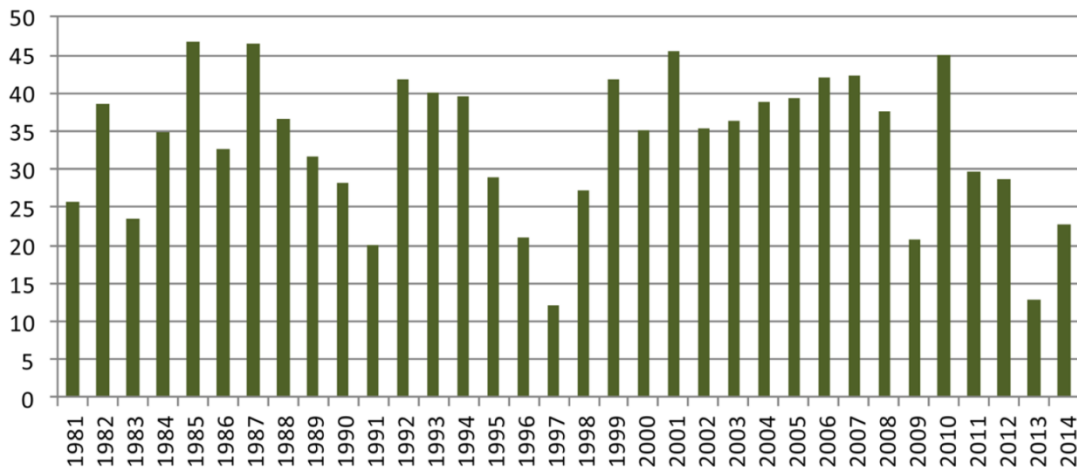


Figura 1. Porcentaje anual de nuevos agentes terapéuticos derivados de productos naturales.

Respecto a los nuevos fármacos para el tratamiento de cáncer aprobados entre 1981 y 2014, de un total de 136, el 87% son productos naturales o basados en ellos, incluso muchos

de los nuevos fármacos sintéticos contienen un farmacóforo proveniente de una fuente natural (Figura 2).

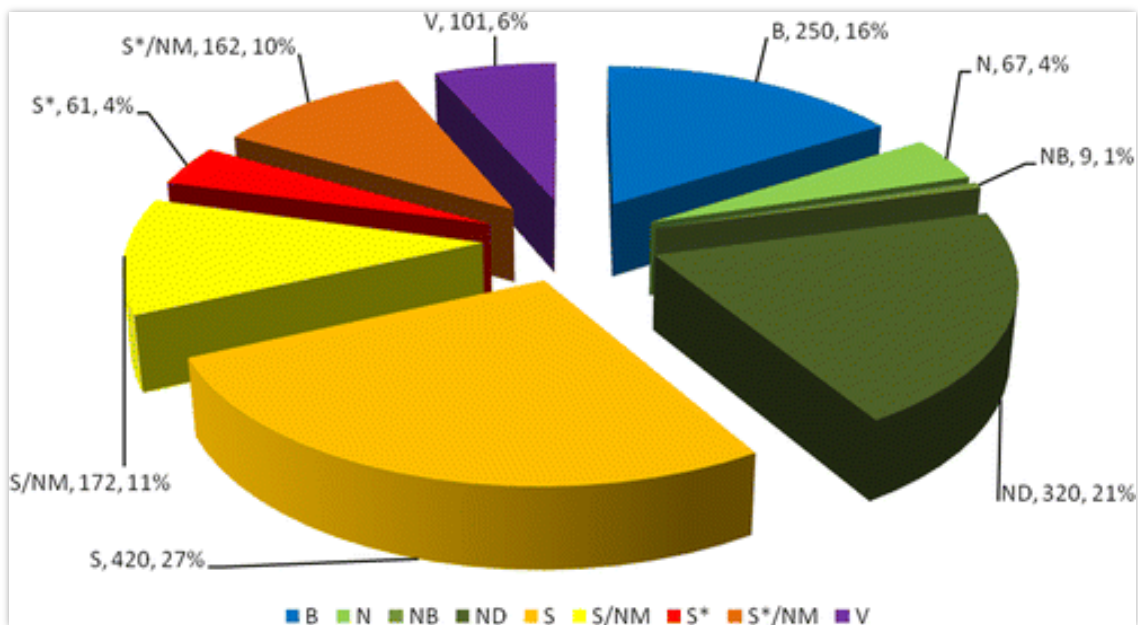


Figura 2. Nuevos fármacos aprobados entre 1981 y 2014 clasificados por su fuente de origen: B, macromolécula biológica; N, producto natural sin alteración; NB, fármaco botánico (mezcla); ND, derivado de un producto natural; S, fármaco sintético; S/NM, inhibidor sintético competitivo de un producto natural; S*, fármaco sintético inspirado en un producto natural; V, vacuna.

Este tipo de estudios demuestra que los productos naturales son un campo de investigación productivo y con gran potencial, especialmente en el área farmacéutica.

En México, la medicina tradicional basada en remedios herbolarios ha sido ampliamente utilizada y aceptada entre la población. En años recientes la comunidad científica se ha dado a la tarea de identificar los compuestos responsables de la actividad biológica en la llamada medicina alópata.

Uno de los jarabes para la tos de origen natural más reconocido es Broncolin®, el cual está elaborado a base de extractos naturales. Este producto, de origen herbolario, comenzó a comercializarse en la capital del país en 1980 y actualmente se exporta a Estados Unidos. Entre los principales componentes de este jarabe se encuentran el extracto de propóleo, gordolobo, eucalipto y miel a los cuales se les ha atribuido sus propiedades curativas.

La apicultura en México es una actividad que ha adquirido gran relevancia socioeconómica, ya que representa una fuente importante de empleos e ingresos en el medio rural y de divisas para el país [9].

México ocupa el sexto lugar en el ámbito mundial por su volumen de producción y nivel de productividad por colmena, mientras que en el continente americano se sitúa en el tercer lugar en ambos rubros (FAOSTAT, 2014).

La miel es el principal producto por peso y valor que se obtiene de las colmenas. El segundo producto apícola de importancia es la cera. Los otros productos con menor jerarquía relativa por cantidad son el polen, propóleo y la jalea real.

La limitada producción de propóleo en nuestro país puede deberse a que la apicultura se enfoca principalmente en la extracción de miel; paralelamente, el ignorar que el propóleo tiene valor farmacéutico, las técnicas para su obtención y la falta de empresas que demanden su compra, contribuyen al lento desarrollo de su producción y uso (Martínez et al., 2004).

Esta investigación se centra en extracto de propóleo y miel como fuente de origen natural de pinocembrina, un producto natural con gran potencial en quimioterapias para el tratamiento de diversas enfermedades crónicas con alto nivel de incidencia en la población mundial.

1.2 Propóleo

El propóleo es una mezcla de resinas naturales producido por las abejas del género *Apis*, a partir de sustancias colectadas de plantas, las cuales se adicionan a sus secreciones orgánicas o salivales [10].

Própolis es un término apícola para las resinas que son utilizadas por las abejas dentro de una colmena, la palabra proviene del griego “pro: enfrente o en defensa y “polis”: ciudad.

El propóleo se añade continuamente a las paredes del nido durante el desarrollo de la colonia; generalmente es utilizado para cubrir los agujeros y grietas en el nido y reducir la entrada de la colmena, de esta manera se mantiene una mejor homeostasis del medio ambiente en el nido. Esto podría dar como resultado la disminución del crecimiento microbiano en las paredes de la colmena, impedir el flujo de aire no controlado en el nido y la impermeabilización de las paredes contra la savia si el nido se encuentra en un árbol, además de protegerlo de la humedad exterior y de los invasores [11].

El propóleo ha presentado diversas actividades farmacológicas, entre ellas antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antiparasitario, antiinflamatorio y anticancerígeno [12–15]. Su actividad biológica depende de su composición química [16] y ésta, a su vez, de la región en donde se recolecte, la estación del año, el clima, el tipo de vegetación, entre otros factores.

En general se compone de 50% resinas y bálsamo vegetal, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias [17]. Hasta ahora se han encontrado en el propóleo más de 250 compuestos. En general, se han aislado terpenos, polisacáridos, ácidos aromáticos, fenoles, ésteres de ácidos fenólicos, minerales, vitaminas y aminoácidos a los cuales puede atribuirse el amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas [14,18,19].

1.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos de origen natural derivados de una clase de benzo- γ -pirona con una estructura del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la cromona (o benzo-pirona) con un fenilo en posición 2 (Figura 3).

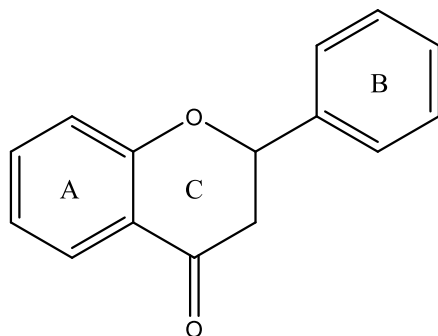


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides están distribuidos ampliamente entre las plantas. Las diferencias individuales dentro de cada subclase se determinan por la variación en número y disposición de los grupos hidroxilo, así como por la naturaleza y extensión de alquilación. Los flavonoides tienen múltiples actividades biológicas incluyendo las acciones potentes antialérgicas, antiinflamatorias y antivirales [20]. Uno de los principales flavonoides contenidos en el propóleo es la pinocembrina.

1.3 Pinocembrina

La pinocembrina (5,7-dihidroxi-*flavonona*, C₁₅H₁₂O₄, Figura 4) es un flavonoide abundante en la miel, propóleo y en algunas otras especies de plantas; esta molécula ha demostrado tener actividad biológica como antioxidante, antifúngico, antibacterial, antiinflamatorio y anticancerígeno [21–25]. Además, diversos estudios sugieren que la pinocembrina puede ser utilizada como principio activo para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer,

hemorragia cerebral, enfermedades en el sistema nervioso central y cardiovasculares [2–4,26].

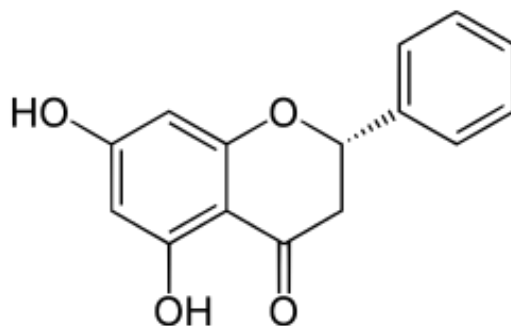


Figura 4. Estructura de la pinocembrina

El análisis de una gran cantidad de compuestos sugiere que aquellos con una solubilidad por debajo de los 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentan limitaciones de biodisponibilidad. La mayoría de los fármacos en el mercado tienen solubilidades por encima de los 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aquellos que se encuentran por debajo de este valor usualmente presentan alta potencia, permeabilidad o un eficiente transporte activo a través de las células epiteliales, lo cual mejora su actividad biológica[27].

A pesar de su gran potencial en formulaciones farmacéuticas, el uso de la pinocembrina está limitado debido a su baja solubilidad.

En esta investigación uno de los principales objetivos es aumentar la solubilidad en agua de la pinocembrina empleando nanoacarreadores biocompatibles que ayuden a potencializar las aplicaciones terapéuticas de esta molécula.

1.4 Liposomas

Los fosfolípidos son moléculas anfífilas distribuidos ampliamente en fuentes naturales de origen vegetal y animal. Se pueden encontrar en aceites vegetales de soya, girasol, canola, maíz y semillas de algodón; así como en yema de huevo y cerebro bovino [28].

Existe una amplia variedad de fosfolípidos debido a la variación en la cabeza polar, las cadenas hidrocarbonadas y los alcoholes presentes en su estructura. Los más abundantes en los tejidos humanos son conocidos como fosfatidilcolinas o lecitinas, las cuales están formadas por una porción polar que se compone de una base nitrogenada y un grupo fosfato unidos al grupo 1,2-diacilglicerol que contiene las colas hidrocarbonadas de un ácido graso. En este estudio se utilizó dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), un fosfolípido sintético con 14 carbonos en la cadena de acilo (Figura 5).

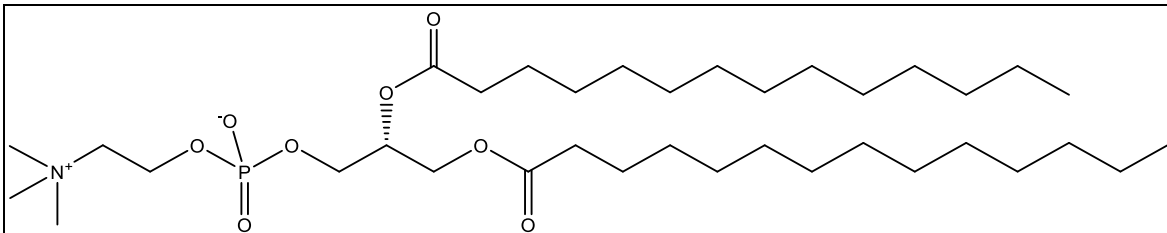


Figura 5. Estructura del fosfolípido dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)

La naturaleza anfipática de los fosfolípidos les permite adoptar estructuras organizadas cuando se ponen en contacto con un sistema acuoso.

Los liposomas son estructuras esféricas formadas por una bicapa o una serie concéntrica de múltiples bicapas lipídicas, llamadas lamelas, separadas por un compartimento de agua que encierran un centro acuoso central (Figura 6)[29]. El interés principal en este tipo de vesículas radica en su habilidad para atrapar moléculas de diferente naturaleza, encapsulándolas en el interior hidrofílico o incorporándolas entre los lípidos que forman la bicapa. Esta propiedad ha sido aprovechada como sistema de liberación de fármacos, acarreando moléculas polares, hidrofóbicas y anfifílicas de interés biológico [30–36].

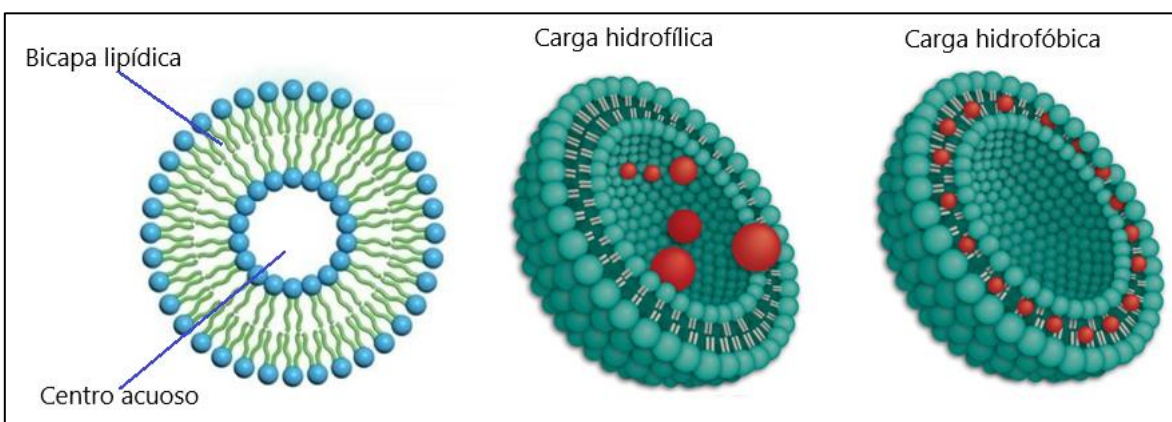


Figura 6. Esquematación de los liposomas

En la industria farmacéutica los liposomas han sido ampliamente utilizados debido a que pueden mimetizarse con las membranas de las células animales permitiendo una efectiva penetración de la molécula encapsulada dentro de los espacios celulares.

Los liposomas formados por lípidos naturales son biodegradables, biológicamente inactivos, con una limitada toxicidad intrínseca. Diversas formulaciones liposomales han sido aprobadas por la FDA [25].

1.5 Liposomas en la industria farmacéutica

La primera formulación basada en liposomas fue aprobada en 1995; se utilizó una mezcla de dos fosfolípidos, fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) y distearoilfosfatidilglicerol (DSPG), además de colesterol, para encapsular anfotericina B. El nombre comercial fue Ambisome® y se utilizó por vía intravenosa para el tratamiento de infecciones fúngicas [36]. Desde entonces, diversas formulaciones liposomales han surgido para el tratamiento de otras enfermedades, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1 [37].

Tabla 1. Formulaciones liposomales aprobadas y en ensayo clínico (denotadas con asterisco).

Principio activo	Composición lipídica	Tratamiento	Vía de administración
Daunorubicin	DSPC, colesterol	Cáncer de sangre	Intravenosa
Verteporfin	DMPC	Degeneración asociada a la edad	Intravenosa
Sulfato de morfina	DOPC, DPPG, colesterol, trioleína	Dolor	Epidural
Doxorubicin	EPC, HSPC, DSPE-PEG, DSPC	Cáncer de mama metastático, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi	Intravenosa
Paclitaxel*	DOPC, colesterol, cardiolipin	Cáncer de mama, ovario y pulmón	Intravenosa
Cisplatino y derivados*	DMPC y DMPG	Carcinoma colorectal	Intrapleural/intravenosa
Amicacin*	DPPC, colesterol	Infección en pulmón	Inhalado
Ácido retinoico*	DMPC, aceite de soya	Carcinoma avanzado de células renales	Intravenosa
Virus de hepatitis A inactivo	DOPC, DOPE	Hepatitis A	Intramuscular

DSPC (diestearoilfosfatidilcolina); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DOPC (dioleoilfosfatidilcolina); DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol); EPC (fosfatidilcolina de huevo); (HSPC) fosfatidilcolina hidrogenada de soja; DSPE (distearoil-sn-glicero-fosfoetanolamina); PEG (polietilenglicol); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina); DOPE (dioleoil-sn-glicero-fosfoetanolamina).

La adición de colesterol, en las formulaciones liposomales, juega un papel muy importante; la cantidad adecuada de este esteroide puede modificar la fluidez, estabilidad, capacidad de encapsulación y liberación de las membranas lipídicas [38]. Numerosos estudios sobre el uso de colesterol como estabilizador demuestran que esta sustancia puede aumentar la hidrofobicidad en la bicapa favoreciendo la inclusión de moléculas hidrofóbicas, mejorar el empaquetamiento de moléculas de fosfolípidos, reducir la permeabilidad de la bicapa a solutos electrolíticos y no electrolíticos, disminuir la tendencia de las vesículas a la agregación y evitar las interacciones entre los fosfolípidos con las proteínas del plasma en el torrente sanguíneo, lo cual conlleva a la desestabilización del liposoma [39–43].

1.6 Caracterización de liposomas

La caracterización de los liposomas permite predecir su desempeño *in vitro e in vivo* [43]. Las principales características estudiadas son el tamaño, forma, carga superficial, eficiencia de encapsulación y comportamiento termotrópico.

La distribución de tamaño y morfología de los liposomas son parámetros importantes dependiendo de la vía de administración. La medición de estas propiedades se puede llevar a cabo mediante microscopía electrónica, cromatografía de exclusión de tamaño y dispersión dinámica de luz.

Las propiedades termodinámicas de los liposomas están relacionadas con su composición lipídica. La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una poderosa herramienta para la caracterización fisicoquímica de las formulaciones liposomales ya que permite conocer el cambio en la estructura de la bicapa debido a las interacciones con las moléculas huésped.

Mediante DSC se puede determinar con precisión si la membrana del liposoma y/o el fármaco sufren una transición de fase, así como su estabilidad, fluidez y permeabilidad [44]. Estas características tienen un papel muy importante en la formulación ya que de ellas depende la encapsulación, transferencia y liberación del principio activo [45]

La combinación de diferentes técnicas de análisis permite un mayor entendimiento de las propiedades de los liposomas.

2. HIPÓTESIS

La pinocembrina, una molécula hidrofóbica, se incorporará entre la bicapa lipídica de liposomas de DMPC.

El colesterol mejorará la estabilidad en disolución de los liposomas y favorecerá la inclusión de pinocembrina.

Se puede diseñar un sistema de liberación de pinocembrina en liposomas de DMPC con colesterol.

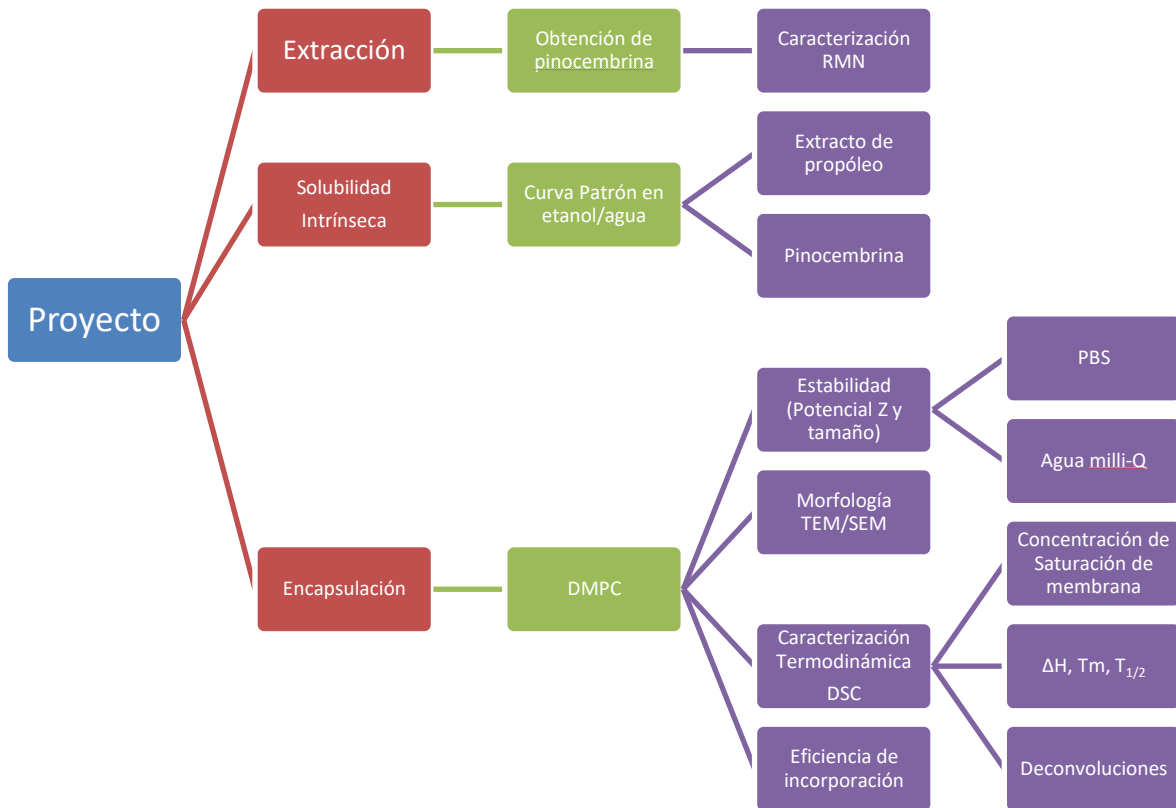
3. OBJETIVO GENERAL

- Solubilizar pinocembrina en la membrana lipídica de liposomas de DMPC y realizar un estudio fisicoquímico de la interacción de pinocembrina con liposomas de DMPC con colesterol. Este estudio puede servir de base en el desarrollo de una nueva formulación para el tratamiento de diversas enfermedades; particularmente, cáncer.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el extracto etanólico de propóleo y extraer pinocembrina del mismo.
- Determinar la solubilidad intrínseca del extracto de propóleo y pinocembrina.
- Encapsular pinocembrina en liposomas de DMPC
- Caracterizar el comportamiento termotrópico de los sistemas liposomales utilizando DSC. Determinar si la membrana del liposoma experimenta una transición de fase. Obtener los parámetros termodinámicos entalpía de transición (ΔH), temperatura de transición (T_m) y cooperatividad molecular ($T_{1/2}$) asociados a dicha transición.
- Determinar la morfología y tamaño de los sistemas en estudio por medio de microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz.
- Determinar la eficiencia de incorporación de pinocembrina en los liposomas preparados.
- Estudiar la diferencia entre los liposomas preparados en agua milli-Q y en medio amortiguado (buffer fosfatos).
- Estudiar el efecto de la incorporación de colesterol en los liposomas cargados con pinocembrina.

5. ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO



6. MATERIALES Y REACTIVOS

6.1 Obtención de extracto de propóleo y fragmentación

En la Tabla 2 se presentan las propiedades de los reactivos utilizados en la obtención de pinocebrina a partir del extracto de propóleo.

Tabla 2. Reactivos utilizados en la obtención de extracto de propóleo y separación de pinocebrina

NOMBRE	LOTE	CAS	PUREZA	PROVEEDOR
ETANOL	P22C64	64-17-5	99.95	J.T. BACKER
DICLOROMETANO	012315A	75-09-2	99.5	BDH
ACETONA	052113A	67-64-1	99.5	BDH
METANOL	111312A	67-56-1	99.8	BDH
SÍLICA GEL 60 (0.063-0.200 mm)	TA1859834	7631-86-9	-	MERCK

6.2 Solubilidad intrínseca y eficiencia de incorporación

En la Tabla 3 se muestran los reactivos utilizados en los experimentos de determinación de la solubilidad intrínseca en agua de la pinocembrina y eficiencia de incorporación en liposomas.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la determinación de solubilidad de pinocembrina y eficiencia de incorporación

NOMBRE	LOTE	CAS	PUREZA	PROVEEDOR
ETANOL	L46C59-5	64-17-5	99.9	J.T. BAKER
PINOCEMBRINA	MKBZ2780V	480-39-7	95	SIGMA-ALDRICH

6.3 Preparación de liposomas

Los liposomas se prepararon con los reactivos descritos en la Tabla 4.

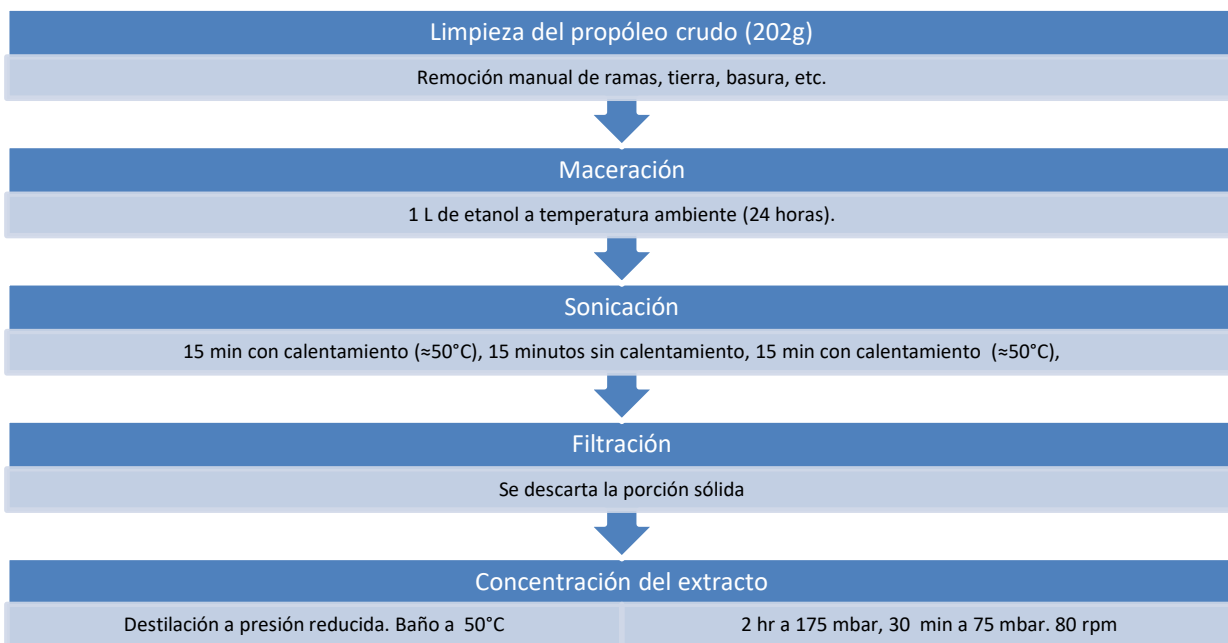
Tabla 4. Reactivos utilizados en la preparación de liposomas

NOMBRE	LOTE	CAS	PUREZA (%)	PROVEEDOR
DMPC	88F-8377	<u>18194-24-6</u>	99	SIGMA
DICLOROMETANO	T34C64	75-09-2	99.98	J.T. BAKER
PINOCEMBRINA	MKBZ2780V	480-39-7	95	SIGMA-ALDRICH
COLESTEROL	00217HM	57-88-5	98	ALDRICH
FOSFATO DE SODIO MONOBÁSICO H ₂ O	C17C00	10049-21-5	99.6	J.T. BAKER
FOSFATO DE SODIO DIBÁSICO 7H ₂ O	A47C24	7782-85-6	100	J.T. BAKER

7. METODOLOGÍA

7.1 Obtención de Extracto de Propóleo

El propóleo utilizado en este estudio se obtuvo de una muestra mexicana, colectada en un apiario experimental ubicado en Fresnillo, Zacatecas por el MVZ Ángel López Ramírez. La obtención del extracto etanólico de propóleo se realizó por la técnica de maceración, de acuerdo con la metodología desarrollada por el Dr. Fausto Rivero Cruz y su grupo de colaboradores [46], la cual se resume en el siguiente esquema:



Se obtuvieron 150 gramos de un extracto líquido viscoso color ámbar oscuro (Figura 7). El rendimiento fue del 74.25%.

El extracto de propóleo se secó con vacío en un rotavapor, antes del primer uso, de esta manera se aseguró que la muestra no contenía restos de etanol. El extracto se mantuvo a 4°C antes de ser utilizado para cualquier experimento.



Figura 7. Extracto etanólico de propóleo

7.2 Obtención de pinocembrina a partir de extracto de propóleo

Para separar la pinocembrina contenida en el extracto de propóleo se siguió la metodología desarrollada por el grupo de investigación dirigido por el Doctor Fausto Rivero Cruz mediante la técnica de cromatografía en columna fase normal eluida con un gradiente de diclorometano-acetona [46].

En un mortero se agregó el extracto de propóleo, 20 mL de diclorometano/acetona (1:1 v/v) y 750 gramos de sílica gel, se mezclaron uniformemente y se empaquetaron en una columna cromatográfica (fase estacionaria). La columna se secó con vacío durante 24 horas.

La separación de los componentes del extracto se logró haciendo pasar a través de la columna disolventes con diferente polaridad (fase móvil). El disolvente eluye por efecto de la gravedad y con ayuda de vacío, arrastrando las moléculas del extracto de propóleo que tienen una polaridad semejante a la del disolvente.

El procedimiento se realizó con 1L de disolvente en cada elución, aumentando la polaridad de la fase móvil; desde una mezcla poco polar de hexano/diclorometano (1:1 v/v) hasta utilizar acetona, un disolvente altamente polar. En la Figura 8 se esquematiza la metodología.

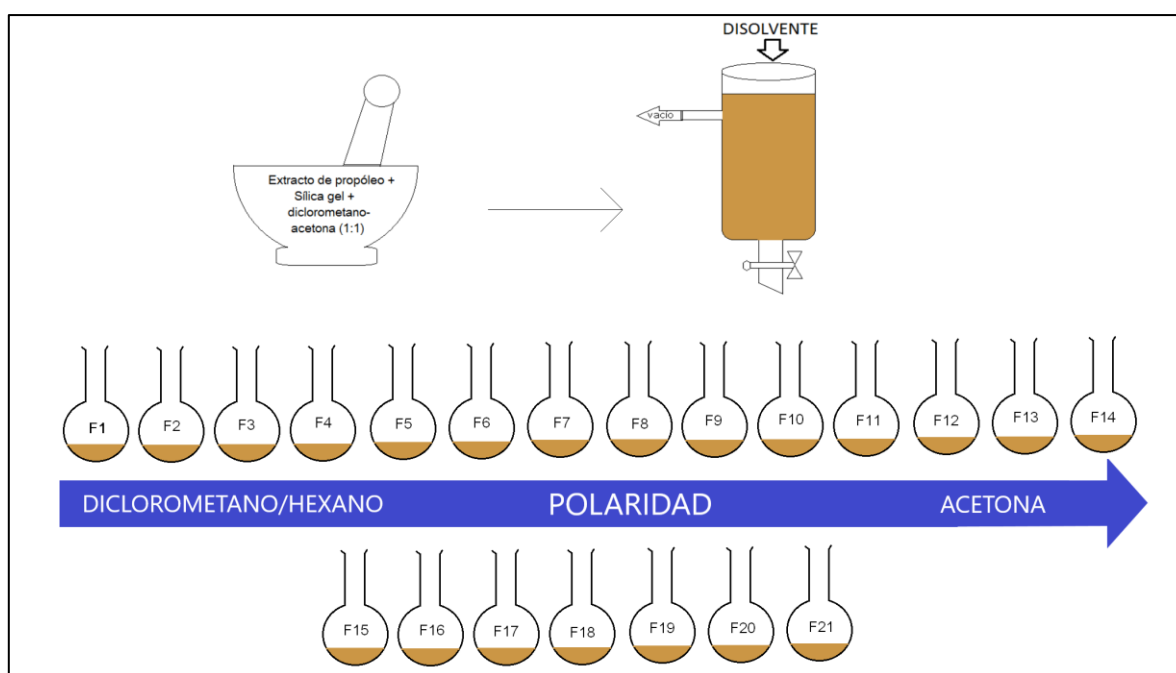


Figura 8. Esquematación de la separación de pinocembrina a partir de extracto de propóleo por el método de cromatografía en columna fase normal.

Se colectaron 23 fracciones, las cuales se concentraron evaporando el disolvente en un rotavapor. En la Tabla 5 se detalla la composición los disolventes utilizados. Cada fracción colectada se sometió a dos pruebas cualitativas: cromatografía en placa para la determinación de impurezas y revelado con vainillina sulfúrica como indicador cualitativo de la presencia de pinocembrina.

Tabla 5. Disolventes utilizados como fase móvil para separar pinocebrina del extracto de propóleo

Fracción	Fase móvil	Fracción	Fase móvil	Fracción	Fase móvil
F1	Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	F9	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (90:10 v/v)	F17	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (60:40 v/v)
F2	Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	F10	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (90:10 v/v)	F18	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (60:40 v/v)
F3	Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	F11	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (85:15 v/v)	F19	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (40:60 v/v)
F4	Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	F12	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (85:15 v/v)	F20	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (20:80 v/v)
F5	Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	F13	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (80:20 v/v)	F21	Acetona
F6	CH ₂ Cl ₂	F14	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (70:30 v/v)	F22	Acetona
F7	CH ₂ Cl ₂	F15	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (70:30 v/v)	F23	Acetona
F8	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (95:5 v/v)	F16	CH ₂ Cl ₂ /Acetona (70:30 v/v)		

Para determinar cualitativamente la presencia de impurezas de las fracciones colectadas, se les realizó una cromatografía en capa fina con una placa de sílica gel 60, utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano-acetona en proporciones 95:5 o 90:10 v/v. Las placas se observaron en una cámara de luz UV a 254 nm (Figura 9).

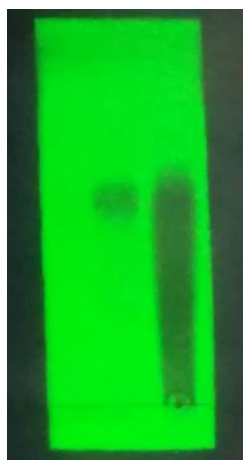


Figura 9. Observación de placa cromatográfica con luz UV a 254 nm. A la izquierda se observa sólo una mancha (la fracción colectada está pura). A la derecha el patrón continuo indica que la fracción contiene diversos componentes.

Las fracciones que tuvieron un perfil cromatográfico similar entre ellas se juntaron, ya que sugieren una composición semejante, para posteriormente ser purificadas. Si la placa cromatográfica mostraba una o dos manchas en el perfil de elución, se realizaba una recrystalización en metanol como método de purificación.

Cada placa cromatográfica obtenida se empapó con solución de vainillina sulfúrica; posteriormente, la placa se colocó en una parrilla de calentamiento (40-50 °C) hasta que comenzara a secarse. Si las manchas en la placa se tornaban de color rosa mexicano, la prueba se consideraba positiva a la presencia del flavonoide (Figura 10).



Figura 10. Revelado con vainillina sulfúrica, la coloración rosa es indicativo de la presencia de pinocembrina

En las fracciones 2-7 se detectó cualitativamente la presencia de pinocembrina. La placa cromatográfica de la fracción 7 estaba prácticamente pura por lo que se recrystalizó de metanol y se filtró con ayuda de un matraz kitasato obteniendo 187.5 mg de producto, lo cual representa el 0.13% de rendimiento. Las fracciones 2-6 presentaron una cromatoplaca similar por lo que se juntaron y disolvieron en metanol, se dividió en dos porciones, se filtraron y recrystalaron en acetona obteniendo 0.0356 g y 0.1014 g respectivamente, estas muestras contenían además de pinocembrina otros flavonoides, los cuales no se caracterizaron ni utilizaron en la presente investigación.

La metodología de trabajo se esquematiza en la Figura 11:

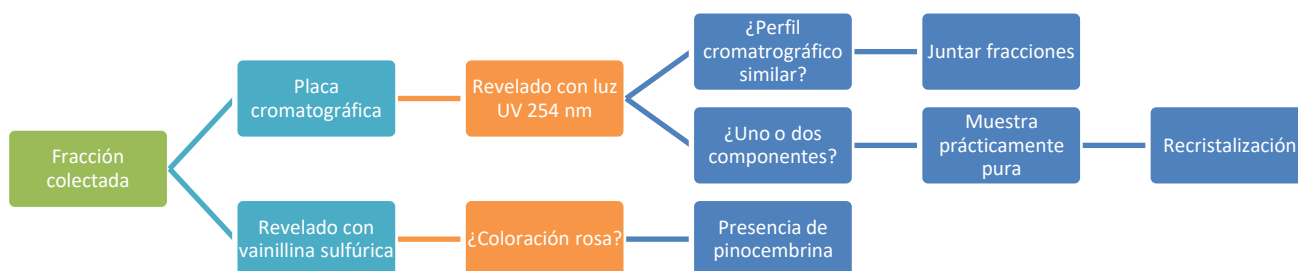


Figura 11. Metodología de trabajo para la separación de pinocembrina del extracto de propóleo.

7.3 Caracterización de pinocembrina por RMN

Para confirmar que la sustancia que se extrajo del propóleo fue pinocembrina, se realizó un estudio de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (DMSO) y ^1H (piridina-d5). Los espectros se presentan en las Figuras 13 y 14. La asignación de las señales se detalla en la Tabla 6 de acuerdo con la numeración de elementos de la Figura 12. Los desplazamientos químicos coinciden con los resultados reportados en la literatura [47].

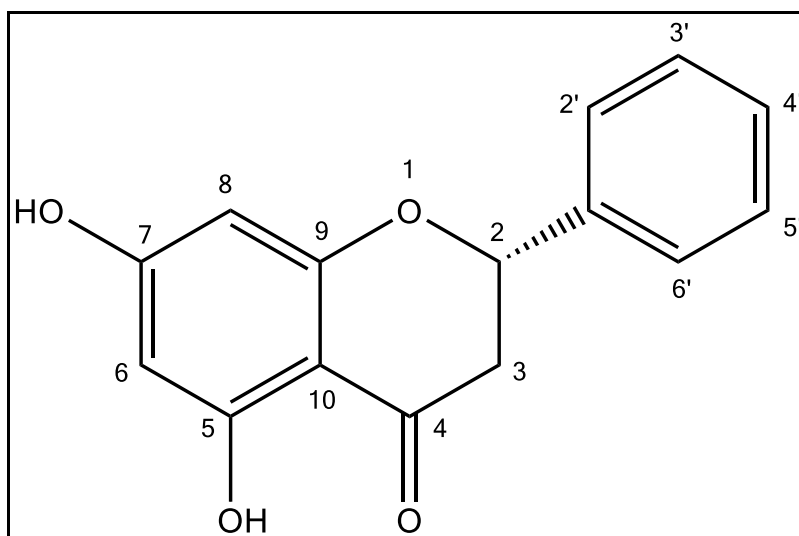


Figura 12. Estructura de la pinocembrina y numeración utilizada en la asignación de señales por RMN

Tabla 6. Asignación de señales de los desplazamientos químicos encontrados por RMN

Posición	Desplazamiento químico ^{13}C	Desplazamiento químico ^1H
2	78.60	5.55 (dd) J(12.9,3.1)
3	42.31	3a 3.21 (dd) J(17.1,12.9) 3b 2.91 (dd) J(17.1,3.1)
4	196.16	---
5	163.71	(OH) 12.77
6	96.18	6.41 (d) J(2.2)
7	≈162	OH no detectado
8	95.31	6.49 (d) J(2.1)
9	163.71	---
10	---	---
1'	138.93	---
2'; 6'	126.87	7.50
3'; 5'	128.79	7.41 (m)
4'	128.79	7.41 (m)

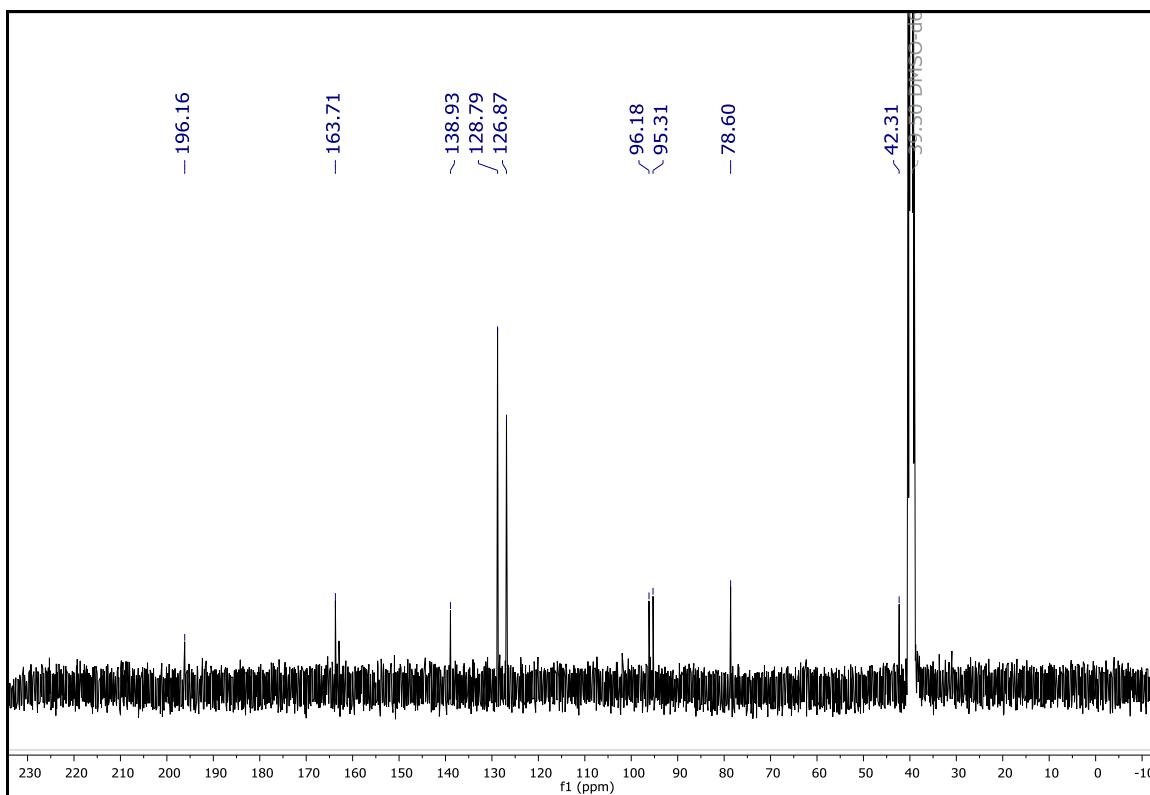


Figura 13. Espectro RMN ^{13}C de pinocembrina en DMSO

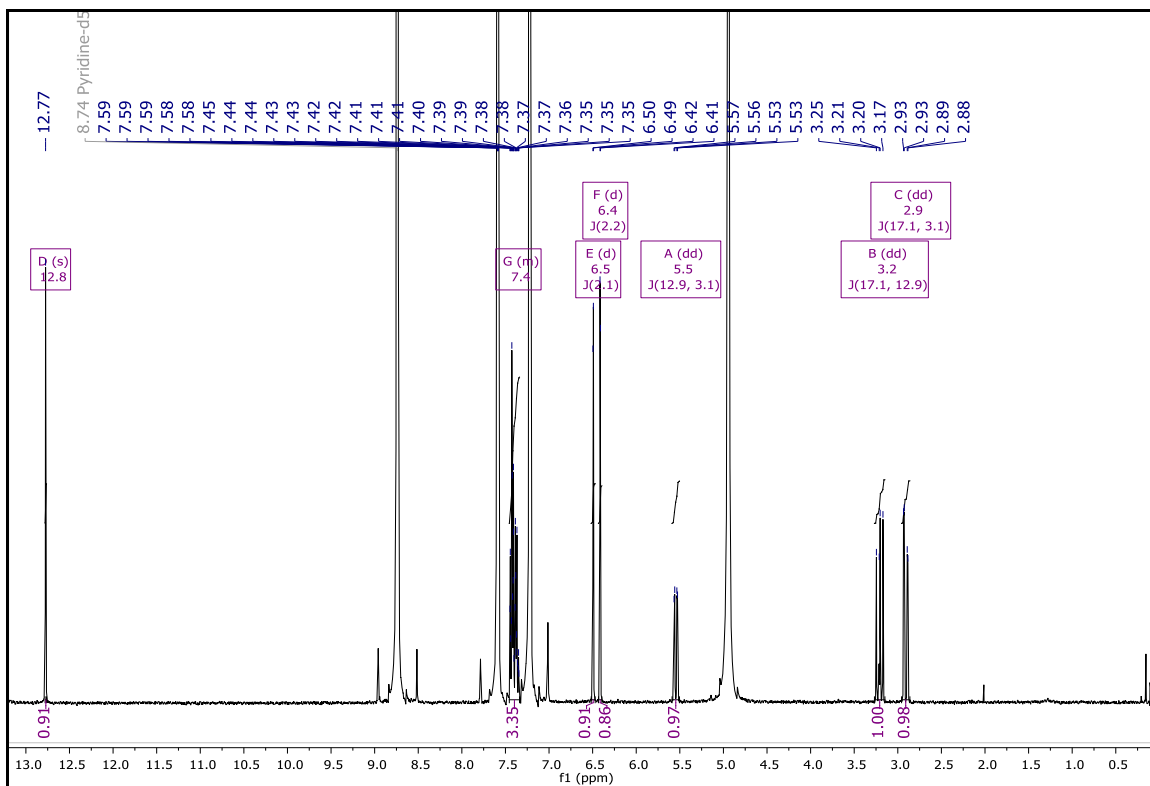


Figura 14. Espectro RMN ^1H de pinocembrina en piridina-d5

7.4 Solubilidad intrínseca

La solubilidad de la pinocebrina (PINO) en agua se determinó por medio de espectroscopia UV-VIS (Varian CARY 50, Australia).

Primero se construyó una curva patrón de pinocebrina, utilizando etanol absoluto como disolvente. Se preparó una disolución madre de concentración 0.118 mg/mL a partir de la cual se prepararon estándares de 2 a 14 $\mu\text{g/mL}$ y su absorbancia se midió en el UV realizando un barrido de 400 a 200 nm. Se obtuvieron dos máximos de absorción a 205 y 290 nm (Figura 15), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura [48,49]. Se utilizó la segunda señal para realizar una gráfica de absorbancia en función de la concentración. El experimento se realizó por triplicado.

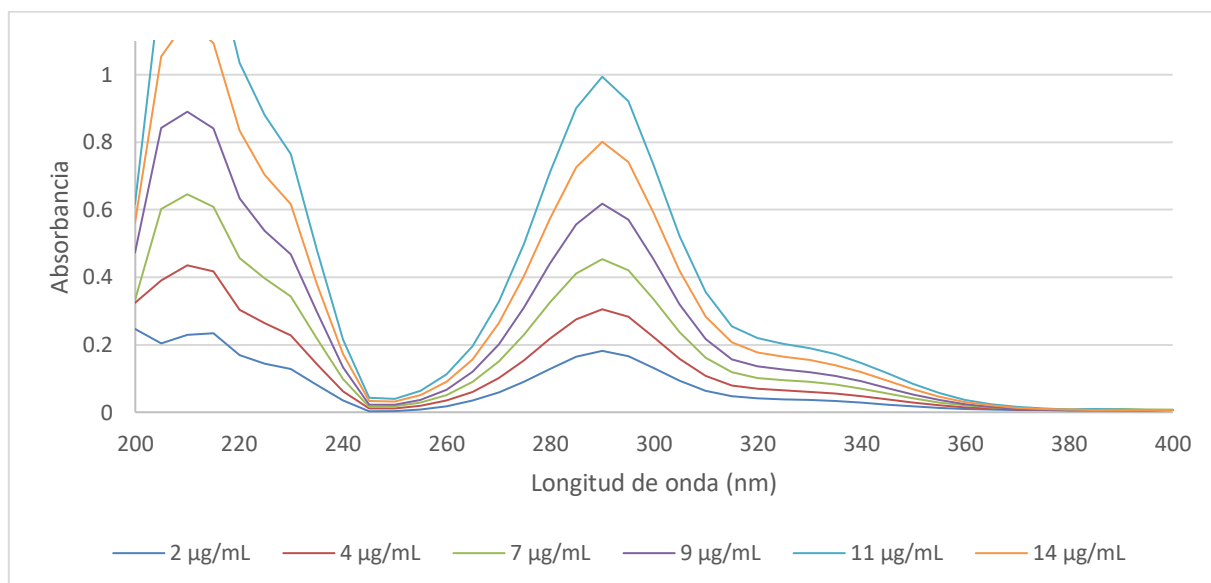


Figura 15. Espectro de absorción de pinocebrina en etanol en función de la concentración

Con los datos registrados, se obtuvo la regresión lineal de la curva patrón para obtener una ecuación que relacionara la absorbancia con la concentración de la muestra, el gráfico se muestra en la sección de resultados. La solubilidad intrínseca se determinó agregando un exceso de pinocebrina en agua milli-Q. La mezcla se agitó durante 72 horas a 25°C, posteriormente, se filtró la disolución para eliminar el sobrenadante no disuelto, utilizando un filtro para jeringa con membrana de nylon de 0.45 μm . Se tomó una alícuota de 20 μL del filtrado y se disolvió en 980 μL de etanol. Se midió la absorbancia de la muestra y con ayuda de la ecuación de la línea recta obtenida en cada caso se calculó la solubilidad. El experimento se realizó por triplicado.

El mismo procedimiento se siguió para determinar la solubilidad del extracto de propóleo en agua.

7.5 Preparación de liposomas

La preparación de liposomas se llevó a cabo mediante la técnica de hidratación de película con algunas modificaciones (Figura 16) [50]. Este método consiste en disolver los fosfolípidos en un disolvente orgánico el cual se evapora con ayuda de un rotavapor. En el fondo del matraz empleado se forma una película fina la cual se hidrata para formar espontáneamente los liposomas. Con esta metodología se obtienen vesículas multilaminares con una amplia distribución de tamaños. Para homogenizar la suspensión liposomal, ésta se sometió a 30 minutos de sonicación y posteriormente se hizo pasar 15 veces por un filtro de policarbonato de 100 nm, utilizando un extrusor (LIPEXTM EXTRUDER, Canadá), de esta manera es posible obtener liposomas unilamelares con una estrecha distribución de tamaños.

La concentración final de los liposomas fue de aproximadamente 10 mM. La pinocembrina fue adicionada, junto con el disolvente, en concentraciones desde 0.133 a 0.940 mg/mL.

En esta investigación se utilizó agua milli-Q y buffer de fosfatos pH=7.4 para hidratar las películas lipídicas.

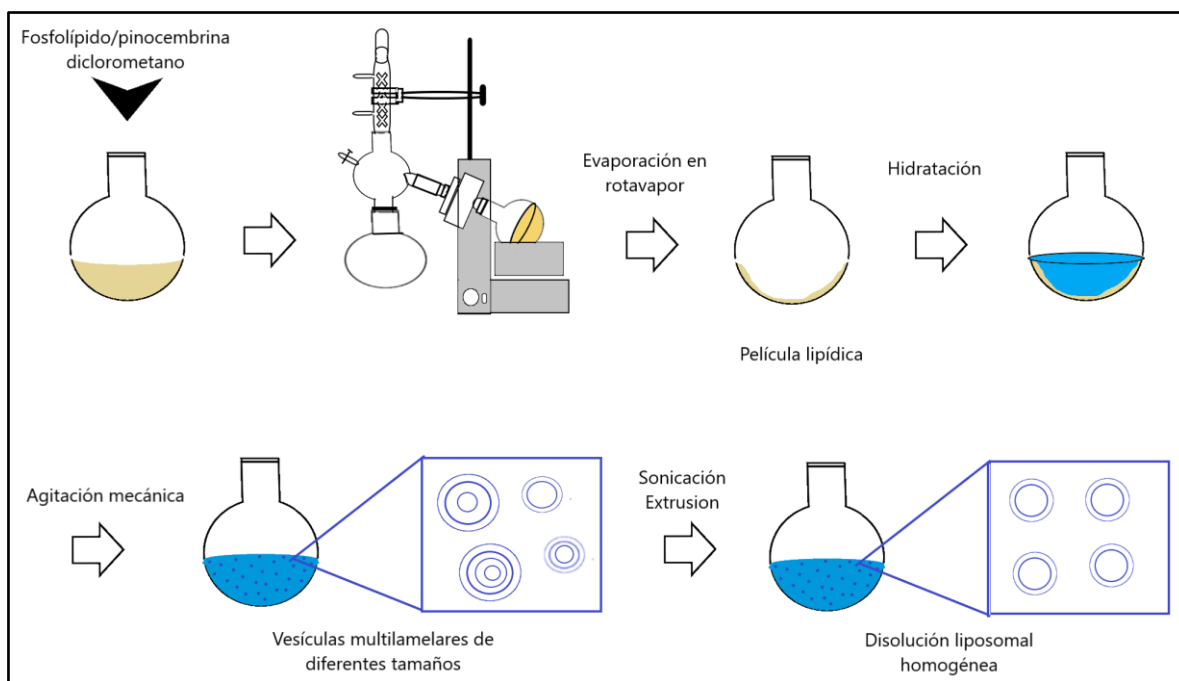


Figura 16. Preparación de liposomas por la técnica de hidratación de película con sonicación y extrusión.

8. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

8.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

Los estudios de DSC se llevaron a cabo utilizando un equipo MicroCal Inc. VP-DSC system (Malvern, USA). Las muestras y las referencias fueron escaneadas en un ciclo de calentamiento-enfriamiento-calentamiento en un intervalo de temperatura de 10 a 70°C. La velocidad de escaneo fue de 90 °C/h, considerando un periodo de filtrado de 10s, el ciclo se repitió 3 veces para asegurar la reversibilidad de la medición. Previamente a la realización de cada experimento, se obtuvo la línea base al colocar el medio de hidratación en ambas celdas, la cual se restó de la traza calorimétrica posteriormente.

Utilizando el software del equipo Microcal Anisys Launcher se obtuvieron los parámetros termodinámicos: temperatura de transición principal (T_m , correspondiente al máximo valor de la capacidad térmica); la entalpía de transición (ΔH , normalizada por mol de fosfolípido y obtenida al determinar el área bajo la curva de la traza calorimétrica), y $\Delta T_{1/2}$ (el ancho de la temperatura a media altura del pico de la transición principal).

En los casos en los que la traza calorimétrica presentó más de un pico, el software Origin Lab 9.0 fue utilizado para encontrar las contribuciones de las señales al pico principal. A este tratamiento de datos se le conoce como deconvolución.

8.2 Determinación de tamaño, estabilidad y morfología

El tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z de los liposomas preparados se determinaron con un equipo Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK) que utiliza la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Las muestras fueron almacenadas a 25°C y analizadas por DLS después de 0, 5, 10, 18, 20, 25, 30 y 35 días o hasta la aparición de un precipitado visible, para determinar la estabilidad de los liposomas en el medio de hidratación.

8.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La superficie y morfología de los liposomas fue observada utilizando un microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-5900-LV (Jeol, USA), y un microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-2010, a través de la Unidad de Servicio De Apoyo a la Investigación

(USAI) de la UNAM. Las muestras se diluyeron 200 veces antes de ser analizadas. En SEM se utilizó recubrimiento de oro, alto vacío y detector de electrones retrodispersados.

Las microscopías fueron examinadas para caracterizar la estructura de las partículas, comparando las diferencias morfológicas de las imágenes.

8.4 Eficiencia de Incorporación

La eficiencia de incorporación (EI) se refiere a la carga de compuestos lipofílicos que se intercalan en la bicapa lipídica y se define como la concentración del material incorporado entre la concentración inicial, ecuación 1. Donde C_{id} es la cantidad de pinocembrina incorporada y C_t es la concentración inicial.

$$EI(\%) = \frac{[C_{id}]}{[C_t]} * 100 \quad (1)$$

La cantidad de pinocembrina incorporada en los liposomas se determinó por espectroscopía UV-vis utilizando la curva patrón en etanol, previamente construida, y el método de centrifugación reversa.

Para separar los liposomas del medio se utilizaron filtros Amicon Ultra-0.5[®], los cuales caracterizan por su capacidad para retener moléculas por encima de un peso molecular específico (Figura 17).

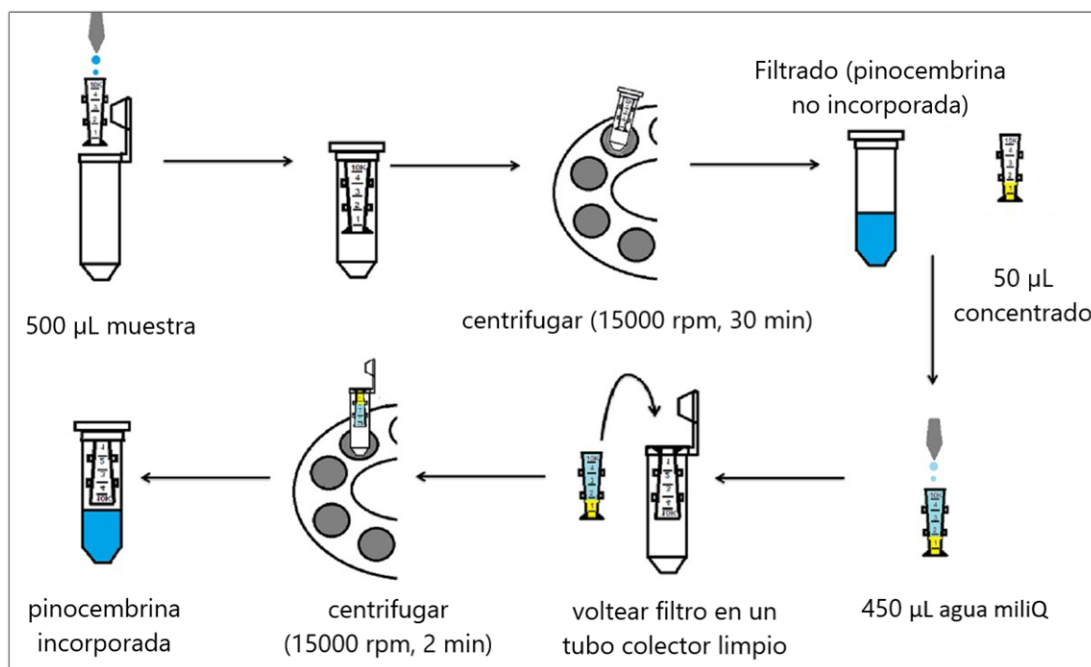


Figura 17. Esquematización de la determinación de eficiencia de incorporación.

Brevemente, 500 μL de la suspensión liposomal se colocaron en el dispositivo de filtrado, la muestra se centrifugó a 15000 rpm, el fármaco libre se recupera en el tubo colector mientras que en el filtro quedan retenidos los liposomas con los fármacos atrapados. Para cuantificar la pinocembrina retenida en el liposoma se utiliza la centrifugación inversa, esta metodología consiste en reconstituir el concentrado al volumen original de la muestra, se coloca el filtro invertido en el tubo de recolección, se centrifuga 2 minutos a 15000 rpm para transferir la muestra al tubo de recolección (UserGuideAmicon[®]), se toma una alícuota se disuelve en etanol y se mide su absorbancia a la longitud de onda correspondiente.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Solubilidad intrínseca de extracto de propóleo

En la Tabla 7 se muestran los datos de tres diferentes experimentos de absorbancia (A), a 290 nm, en función de la concentración del extracto de propóleo (EP). En la Figura 18 se graficaron estos resultados para construir la curva patrón de EP en etanol.

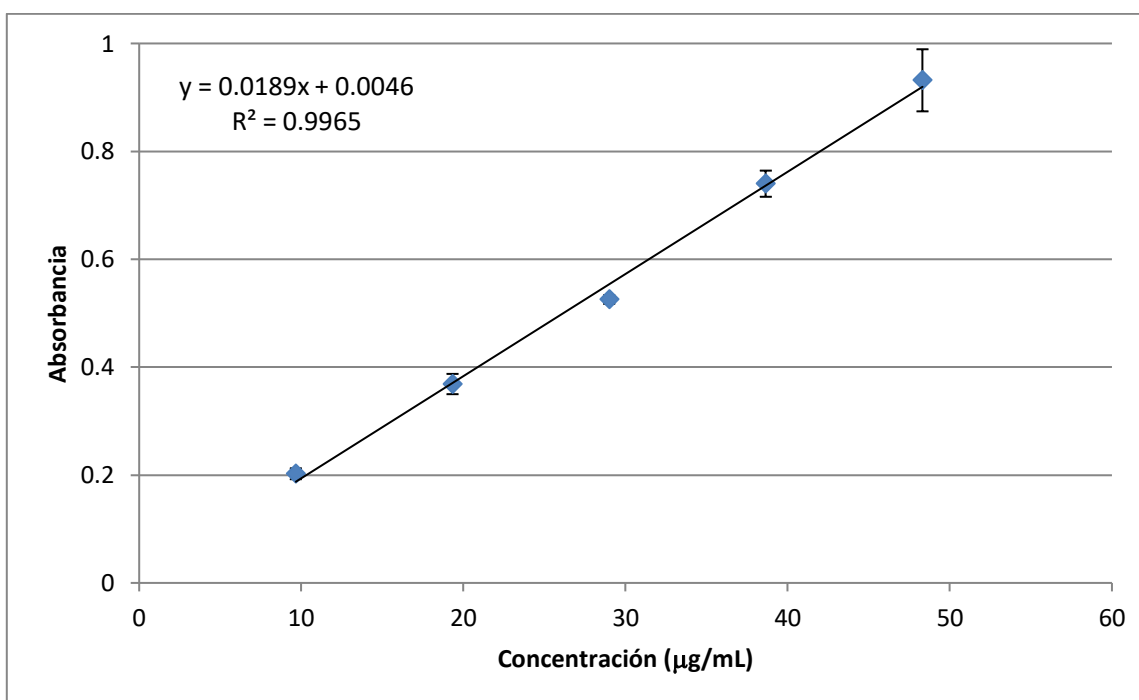


Figura 18. Curva patrón de extracto de propóleo construida con los datos de la Tabla 7.

Tabla 7. Datos experimentales de absorbancia (A) en función de la concentración de extracto de propóleo

Concentración (µg/mL)	A exp 1	A exp 2	A exp 3	A promedio
9.7	0.193	0.213	0.201	0.202 ± 0.010
19.3	0.379	0.347	0.38	0.369 ± 0.019
29.0	0.533	0.517	0.526	0.525 ± 0.008
38.7	0.766	0.736	0.718	0.740 ± 0.024
48.3	0.868	0.947	0.98	0.964 ± 0.058

La ecuación 2 corresponde a la regresión lineal de la curva patrón, donde A es la absorbancia del extracto de propóleo a 290 nm y C_{EP} es la concentración en µg/mL.

$$A = 0.0189 C_{EP} - 0.0046 \quad (2)$$

En la Tabla 8 se registran los datos experimentales y resultados de la determinación de solubilidad (S_x) de EP en agua milli-Q, el espectro de absorbancia de la muestra S_3 se presenta en la Figura 19, a manera de ejemplo.

Tabla 8. Mediciones de absorbancia de extracto de propóleo en agua a 25°C.

Experimento	S_1	S_2	S_3
Cantidad de extracto	0.01050	0.01028	0.01003
Absorbancia	0.088	0.104	0.099
Solubilidad (µg/mL)	245	286	273

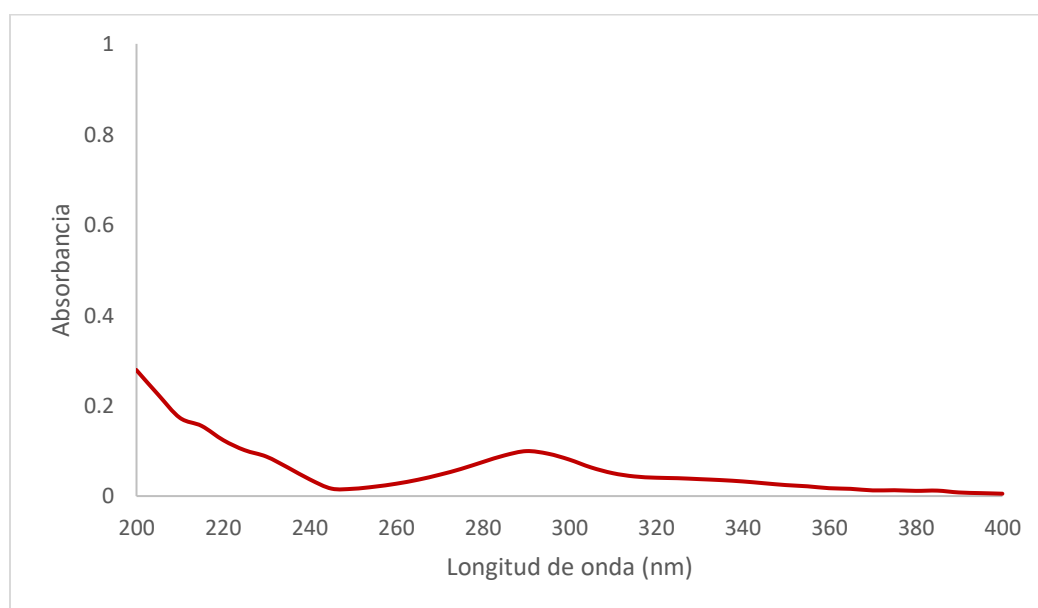


Figura 19. Espectro de absorción de la muestra S_3 para la determinación de solubilidad intrínseca de propóleo en agua milli-Q

El resultado de estas mediciones nos indica una solubilidad de $269 \pm 22 \mu\text{g/mL}$, lo que implica la presencia de varios componentes del extracto de propóleo que son solubles en agua.

9.2 Solubilidad intrínseca de pinocembrina

Si conocemos la cantidad de pinocembrina que puede disolverse en agua podemos calcular el aumento de solubilidad cuando encapsulamos la molécula en liposomas o algún otro nanoacarreador.

Debido a la poca cantidad de pinocembrina obtenida a partir del extracto, las pruebas que se describen a continuación se realizaron con pinocembrina comprada en sigma-aldrich con una pureza del 95%.

Los experimentos que se presentan a continuación se realizaron por triplicado de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Los resultados se registran en la Tabla 9 y en la Figura 20.

La regresión lineal de la curva patrón de pinocembrina en etanol nos arroja la ecuación 3, con la cual podemos calcular la concentración de pinocembrina en una muestra cuya concentración se desconoce. Donde A representa la absorbancia y C_{PINO} , la concentración de pinocembrina.

$$A = 0.0685 C_{PINO} + 0.0112 \quad (3)$$

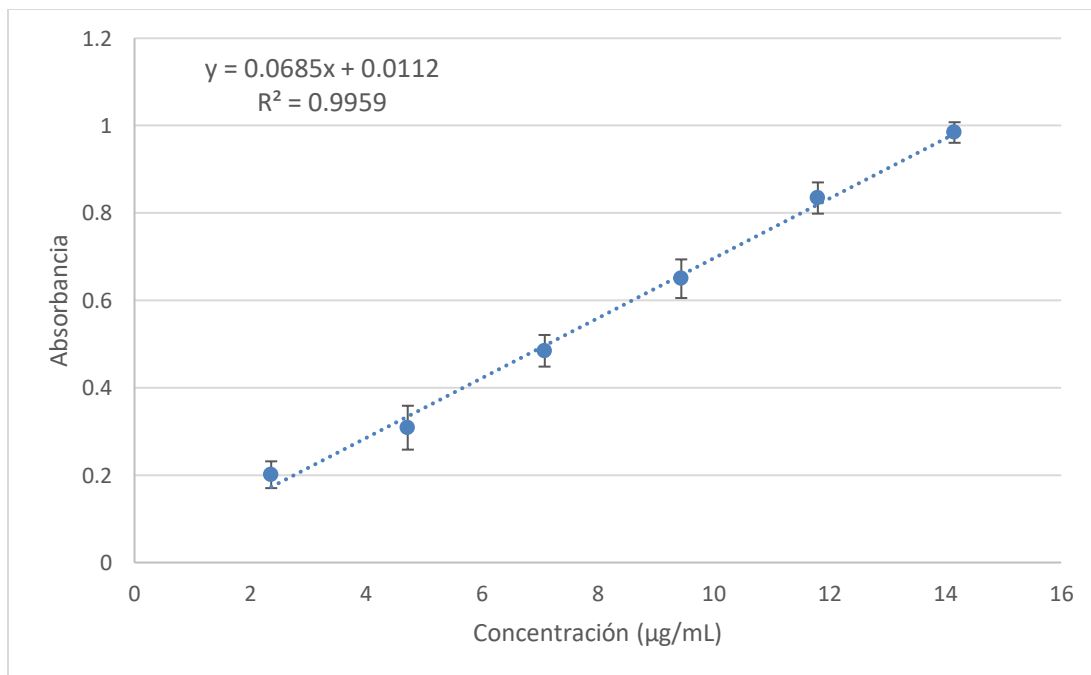


Figura 20. Gráfica de absorción en función de la concentración de pinocembrina en etanol.

Tabla 9. Datos experimentales de absorbancia en función de la concentración de pinocembrina

Concentración (µg/mL)	A exp 1	A exp 2	A exp 3	A Promedio
2.4	0.181	0.175	0.247	0.201 ± 0.031
4.7	0.305	0.237	0.384	0.309 ± 0.050
7.1	0.454	0.461	0.539	0.485 ± 0.036
9.4	0.618	0.615	0.716	0.650 ± 0.044
11.8	0.801	0.797	0.888	0.834 ± 0.036
14.2	0.994	0.949	1.010	0.984 ± 0.024

En la determinación de la hidrosolubilidad intrínseca de pinocembrina, después de tratar de disolver un exceso del flavonoide en agua durante 72 horas a 25°C, no se registró ningún pico de absorbancia cuando se tomó una alícuota de la disolución y se midió en el UV (Figura 21); la prueba se realizó por triplicado. Este resultado indica que la pinocembrina es prácticamente insoluble en agua o su solubilidad está por debajo de la resolución del instrumento.

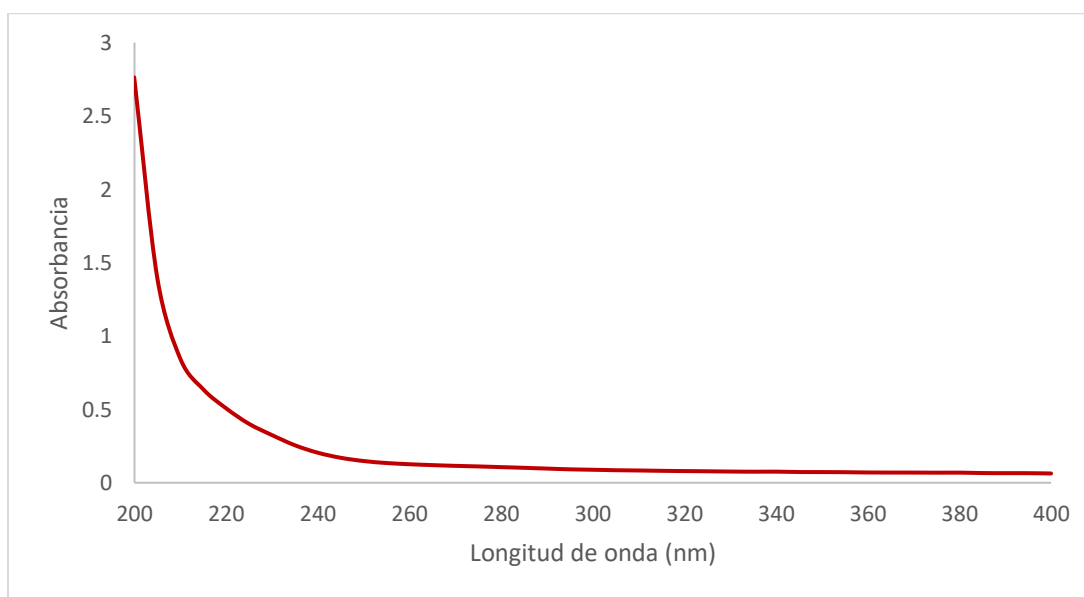


Figura 21. Espectro de absorción de pinocembrina en agua. Alícuota de 50 µL disuelta en 950 µL de etanol

Para descartar el factor de dilución, también se midieron en el UV las 3 muestras directamente (sin dilución en etanol) utilizando como blanco agua, sólo en uno de los experimentos se obtuvo señal (Figura 22), estos resultados confirman que la solubilidad intrínseca de la pinocembrina en agua es menor a 2 µg/mL. Los datos experimentales se registran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados experimentales en la determinación de solubilidad intrínseca de pinocembrina en agua milli-Q.

Experimento	Pinocembrina (mg) en 5 mL de agua milli-Q	Absorbancia a 290 nm alícuota de 50 μ L	Absorbancia 290 nm Sin dilución	Concentración (μ g/mL)
1	0.98	-	-	-
2	0.95	-	-	-
3	0.98	-	0.131	1.75

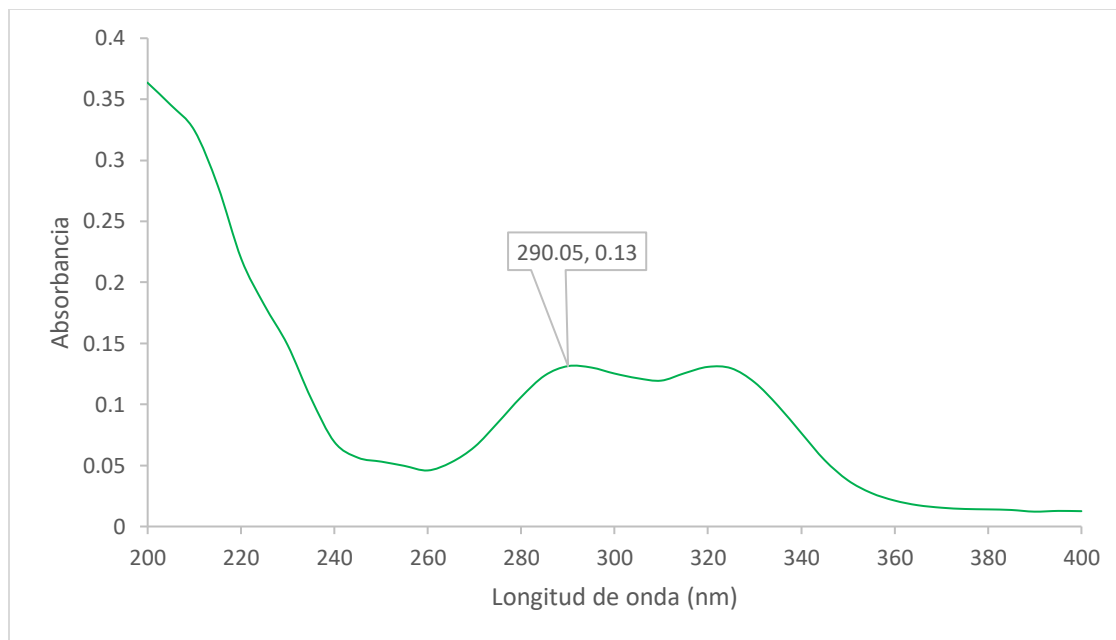


Figura 22. Espectro de absorción de pinocembrina en agua sin dilución.

Si observamos la Figura 22, el espectro de absorbancia de pinocembrina en agua varía significativamente en comparación con el espectro en etanol (Figura 15) lo cual significa que el coeficiente de absorción (ϵ) del flavonoide depende del disolvente utilizado. Este fenómeno se conoce como solvatocromismo, definido como el cambio en el espectro de absorción del cromóforo debido al solvente [51]. Tanjung *et. al.* observó un ligero desplazamiento en los máximos de absorción de pinocembrina en metanol [52].

Un experimento adicional se realizó para determinar la cantidad de agua que puede estar presente en la alícuota sin que se afecte ϵ , para ello se construyeron curvas patrón de pinocembrina en etanol con diferentes proporciones de agua. En la Figura 23 se presentan los resultados. Como puede observarse, la pendiente obtenida de las regresiones lineales es prácticamente la misma cuando se tiene únicamente etanol y hasta un 25% de agua; por lo que, aunque los liposomas estén hidratados en agua milli-Q, la metodología utilizada es válida.

Se puede utilizar la curva patrón en etanol para calcular la cantidad de pinocembrina presente en los liposomas preparados, siempre y cuando se trabaje con porcentajes de agua menores a 25 o se prueben otras mezclas con mayores porcentajes de agua sin que se modifique el espectro de absorción.

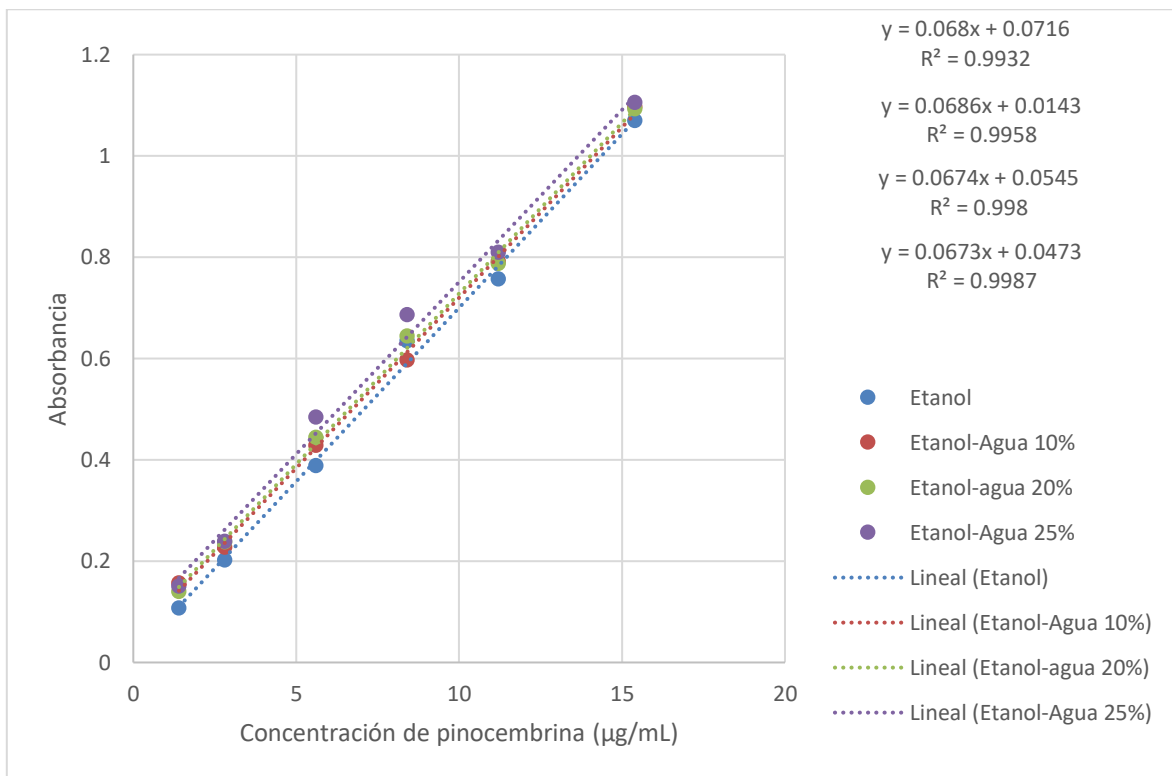


Figura 23. Curva patrón de pinocembrina disuelta en mezclas etanol-agua a diferentes proporciones.

9.3 Transición de fase de los liposomas

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la pinocembrina, es lógico pensar que esta molécula podrá disolverse en la región hidrofóbica de la bicapa; de esta manera, pueden ser acarreada en una formulación farmacéutica.

Diversas investigaciones han utilizado liposomas como sistemas acarreadores de fármacos y otras sustancias [28,37,53,54].

Los liposomas formados por un solo tipo de fosfolípidos (puro) presentan una temperatura de transición de fase característica, asociada a la fusión de las cadenas lipídicas que los conforman; este cambio estructural generalmente se conoce como la temperatura de transición del estado gel al estado líquido cristalino y se denota como T_m .

Para conocer dicha temperatura y la energía involucrada en el proceso se utilizó un calorímetro diferencial de barrido. Este equipo nos permite estudiar las interacciones de los fosfolípidos que forman la membrana lipídica y los cambios estructurales o de empaquetamiento en la misma, como consecuencia del cambio en la temperatura; así como el efecto de agregar componentes en la bicapa, por ejemplo, colesterol o un fármaco hidrofóbico. De esta manera, esta técnica nos permite comprobar si las moléculas de interés se alojan en la membrana. Los resultados que se obtienen directamente del equipo son la entalpía de transición de fase (ΔH), entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH}), la temperatura de transición principal (T_m) y el ancho a media altura del pico $\Delta T_{1/2}$.

La Figura 24 muestra los termogramas obtenidos por DSC de los liposomas de DMPC puro realizado por triplicado. Como puede observarse, el perfil calorimétrico es claramente reproducible en un intervalo de 5 a 70°C (las trazas se superponen).

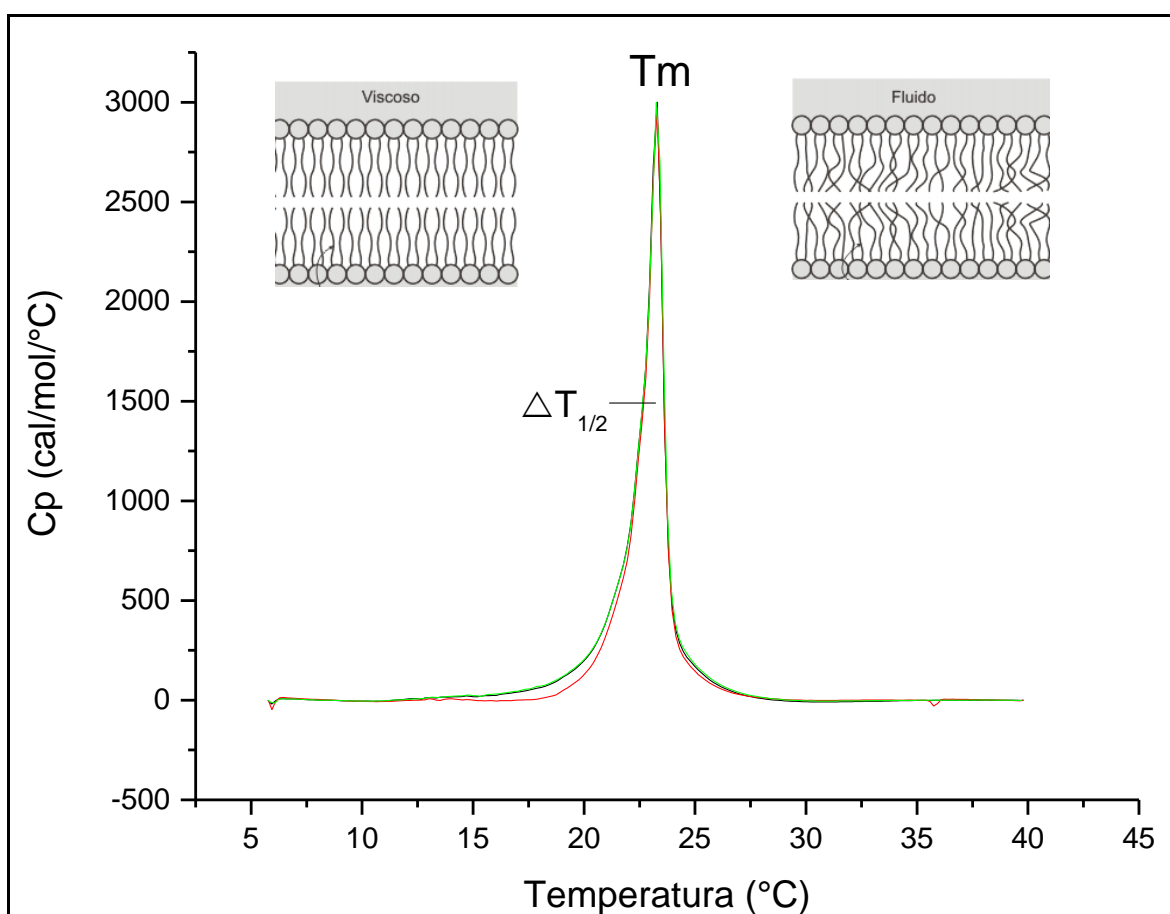


Figura 24. Traza calorimétrica de DMPC puro realizada por triplicado en ciclos de calentamiento-enfriamiento-calentamiento de 0 a 70°C, la gráfica se presenta hasta 40°C para mejorar la escala.

En el gráfico de la figura 24, la temperatura de transición, denotada como T_m , es aquella en la cual la capacidad térmica (C_p) alcanza su máximo valor. La entalpía de transición (ΔH) se determina por la integración del área bajo la curva del pico con ayuda del software del equipo.

$$\Delta H = \int_{T_i}^{T_f} C_p dT \quad (4)$$

La anchura del pico a media altura se denota como $\Delta T_{1/2}$. Este parámetro se ha asociado a la cooperatividad de la transición [33], la cual se discute a detalle más adelante para cada uno de los sistemas estudiados.

La validación de la técnica consistió en reproducir un experimento realizado previamente en el mismo laboratorio de trabajo con el fosfolípido DMPC, bajo condiciones experimentales idénticas y con el mismo equipo. En los liposomas del fosfolípido puro el valor de T_m fue de 23.3°C y el ΔH de 4.54 kcal/mol, estos resultados están en concordancia con los valores reportados en la literatura, validando así los resultados presentados en este trabajo [55–58]. En la Tabla 11 se realiza una comparación de los resultados obtenidos en este estudio contra los reportados previamente.

Tabla 11. Datos termodinámicos de DMPC puro obtenidos de la literatura comparados con los resultados de este estudio

SISTEMA	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DMPC (a)	5.03±0.08	23.97±0.01	1.8
DMPC (b)	4.97±0.04	23.27±0.01	0.90±0.02
DMPC (c)	4.54 ± 0.29	23.27±0.02	0.90 ±0.10

(a) Datos reportados en Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions¹; (b) Armando Mora, Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad De Química, UNAM; (c) Datos experimentales de esta investigación.

9.4 Saturación de la membrana lipídica

Un aspecto relevante en el diseño de sistemas de liberación de fármacos es conocer la cantidad de sustancia que se acarrea. Este valor será importante ya que el efecto terapéutico está asociado con la dosis.

En el caso de los liposomas es necesario evaluar la cantidad máxima del aditivo que se puede incorporar sin que se altere la estabilidad o la integridad de la vesícula.

¹ Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. A Biophysical Chemistry Experiment. Shane M. Ohline, Mary L. Campbell, T. Turnbull, Susan J. Kohler. JChemEd Vol. 78 No. 9 September 2001.

Para conocer la concentración de saturación de la membrana lipídica se prepararon suspensiones liposomales de DMPC en agua milli-Q con diferente concentración de pinocembrina y se midió el comportamiento termotrópico de cada sistema.

Podemos utilizar un modelo de dos estados para cualquier transición que ocurre entre dos fases A y B. La constante de equilibrio de este proceso está dada por la ecuación 5:

$$K = \frac{\alpha_A}{\alpha_B} \quad (5)$$

Dónde α_B y α_A representan la actividad de cada fase. La constante de equilibrio está relacionada con la entalpía por la ecuación de van't Hoff (6):

$$\frac{\delta \ln K}{\delta T} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad (6)$$

La entalpía de van't Hoff, ΔH_{vH} , tiene unidades de energía y es igual a la cantidad de calor requerido por cada unidad cooperativa que sufre la transición de fase. Para un modelo de dos estados, la entalpía de van't Hoff es igual a la entalpía calorimétrica (que se obtiene integrando el área bajo la curva del termograma DSC, con la ecuación 4). Si un sistema no cumple con esta condición debemos considerar que existen estados intermedios durante la transición de fase.

Las unidades cooperativas (UC) miden la cantidad de fosfolípidos que experimentan una transición simultánea. Esto significa que los lípidos no funden independientemente unos de otros, sino que lo hacen como un solo dominio cooperativo. La transición de fase del estado gel a líquido-cristalino es altamente cooperativa, antes de alcanzar la T_m , las moléculas comienzan a reorganizarse para ganar mayor libertad de movimiento. $\Delta T_{1/2}$, se ha asociado con la cooperatividad de la transición de fase [59], a mayor tamaño de la UC, más angosto el intervalo de temperatura durante la transición. Este parámetro es muy sensible a la presencia de cualquier aditivo en la bicapa [60], siendo cada vez mayor a medida que aumenta la concentración de aditivo, lo cual significa que el tamaño de la unidad cooperativa disminuye.

El tamaño de la UC puede calcularse de acuerdo con la ecuación 7

$$UC = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} \quad (7)$$

En la Tabla 12 se presenta la entalpía de ΔH_{cal} y ΔH_{vH} de los sistemas en estudio, así como el tamaño de la unidad cooperativa (UC) obtenidos con el software integrado al DSC.

Tabla 12. Entalpía calorimétrica, entalpía d Van't Hoff y tamaño de la unidad cooperativa en función de la cantidad de pinocebrina

Concentración PINO (mg/mL)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	ΔH_{vH} (kcal/unidad cooperativa)	UC
0	4.54±0.29	372.63±27.31	82
0.133	3.25±0.13	303.07±9.38	93
0.224	2.96±0.03	184.43±3.01	62
0.276	2.92±0.01	149.60±0.56	51
0.330	2.99±0.10	106.20±2.26	35
0.414	2.95±0.10	83.93±2.24	28
0.436	2.70±0.11	78.62±1.54	29
0.480	2.53±0.06	69.48±0.88	27
0.504	1.72±0,02	73.53±4.39	43
0.572	1.59±0.07	73.16±1.44	46
0.630	1.29±0.03	76.85±1.46	60
0.744	1.07±0.06	76.27±1.98	71
0.820	0.78±0.08	85.41±3.07	110
0.860	0.82±0.06	57.34±42.49	70
0.940	1.06±0.06	80.78±1.58	76

En la Figura 25 se presenta el cambio en la entalpía de van't Hoff en función de la concentración de pinocebrina presente en la muestra. Como puede observarse, a medida que aumenta la concentración de pinocebrina, la energía por unidad cooperativa disminuye. Esto significa que un menor número de fosfolípidos participan en la transición de fase debido a las nuevas interacciones que se forman con la pinocebrina.

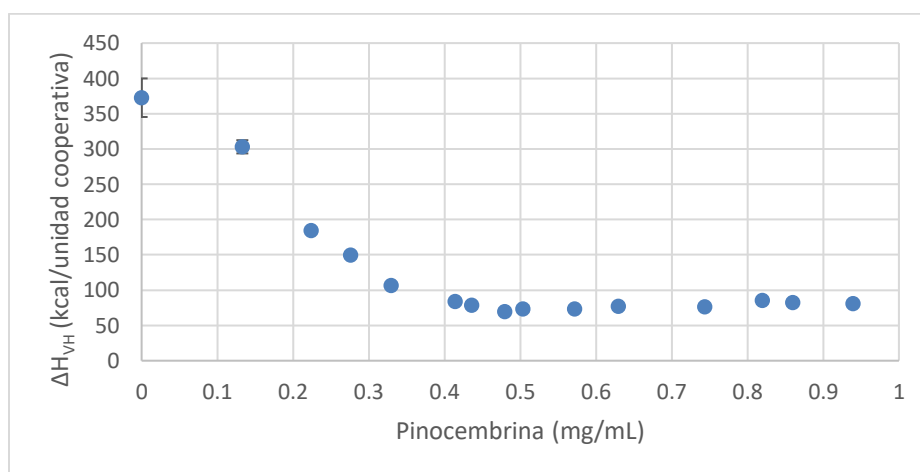


Figura 25. Cambio en la entalpía de van't Hoff en función de la concentración de pinocebrina

En la Figura 26 se grafica la entalpía de van't Hoff en función de la entalpía calorimétrica. Podemos observar que se requiere mayor energía para formar nuevas unidades cooperativas debido a la interferencia del aditivo. Es decir, existe cierta resistencia de las moléculas de la bicapa por la inserción de más aditivo, probablemente por el impedimento estérico entre ellas.

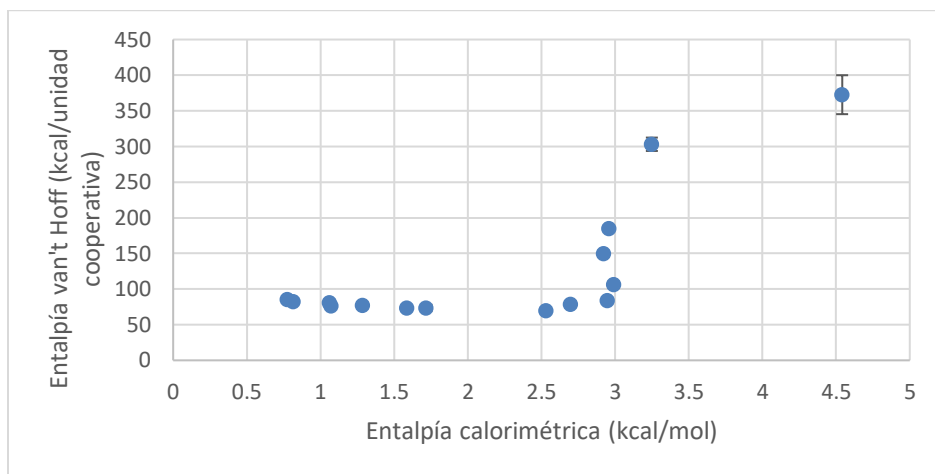


Figura 26. Entalpía de van't Hoff en función de la entalpía calorimétrica

La disminución en el tamaño de la unidad cooperativa es señal del aumento de heterogeneidad entre las moléculas lipídicas de la bicapa (figura 27) [61]. Sin embargo, de 0.48 a 0.82 mg/mL de pinocembrina, empieza a aumentar paulatinamente el tamaño de la UC, probablemente porque hay una reestructuración en la organización del sistema de manera que se maximizan las interacciones entre las moléculas de la misma especie. Esto podría ser la razón por la que comienzan a coexistir diferentes fases en la membrana y por lo tanto se observen dos señales en la traza calorimétrica.

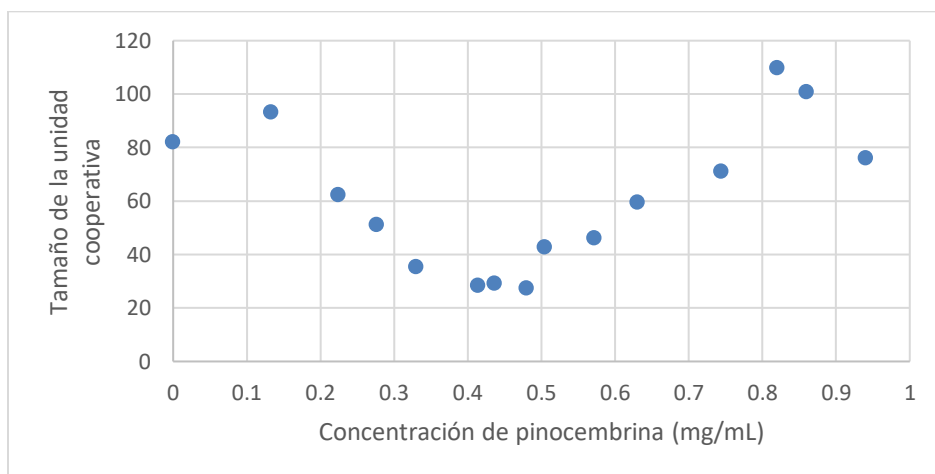


Figura 27. Tamaño de la unidad cooperativa en función de la concentración de pinocembrina

En la Figura 28 se presenta el comportamiento termotrópico de los liposomas de DMPC con concentraciones de pinocembrina desde 0 hasta 0.436 mg/mL. Es claro que al aumentar la concentración de pinocembrina, la temperatura de transición principal se recorre a valores menores; es decir, se favorece el estado líquido cristalino y la membrana se vuelve más fluida, lo cual sugiere una fuerte interacción entre el flavonoide y los grupos acilo del liposoma. Además, el pico se va deformando hasta la aparición de un hombro a 0.436 mg/ml.

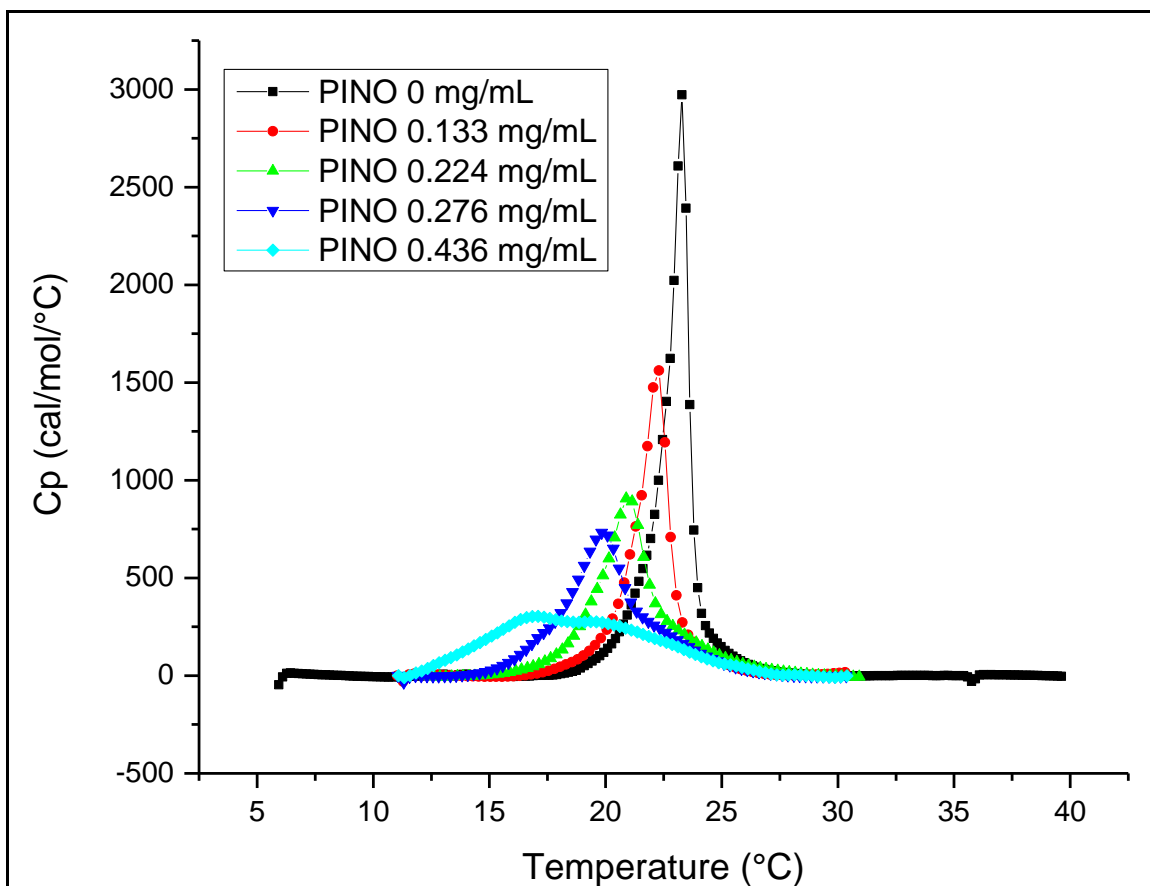


Figura 28. Trazas de DSC de liposomas de DMPC con 0- 0.436 mg/mL de pinocembrina

La forma asimétrica de la traza calorimétrica, la aparición de dos picos o un hombro en el pico principal reflejan la presencia de intermediarios durante la transición de gel a líquido cristalino [57] o formación de dominios con diferente composición. La presencia de un componente adicional en la membrana lipídica, como es la pinocembrina puede guiar a la separación de fases dentro del liposomas tal como ha sido observado en otros estudios de liposomas dopados con moléculas hidrofóbicas [44,62–64].

En la Tabla 13 se presentan los parámetros termodinámicos de los liposomas de DMPC en agua con diferentes concentraciones de pinocembrina obtenidos por DSC.

El aumento de $\Delta T_{1/2}$ en los liposomas estudiados confirma la intercalación de pinocembrina en las cadenas de los grupos acilo de DMPC, disminuyendo la cooperatividad. Con estos resultados se puede inferir que la pinocembrina se aloja en la zona cooperativa de la bicapa, es decir, en la región de los átomos de carbono C1-C8 de la cadena de acilo [65].

A concentraciones de 0.436 y 0.480 mg/mL aparece un segundo pico en la traza calorimétrica. Como se mencionó anteriormente, es probable que se formen dominios dentro de la bicapa con diferente composición, por lo que fue necesario hacer una deconvolución de la señal para identificar la contribución individual de cada pico a los parámetros termodinámicos. Los resultados de esta deconvolución se muestran en la Tabla 13, identificados con un asterisco.

Tabla 13. Parámetros termodinámicos de liposomas de DMPC con diferentes concentraciones de pinocembrina. Las trazas calorimétricas con dos picos, a y b, se identifican con un asterisco; los resultados presentados corresponden a la deconvolución.

Pinocembrina (mg/mL)	ΔH_{cal} (kcal/mol)		T_m (°C)		$\Delta T_{1/2}$ (°C)	
0	4.54±0.29		23.3±0.0		0.9±0.1	
0.133	3.25±0.13		22.3±0.0		1.3±0.1	
0.224	2.96±0.03		21.0±0.1		2.2±0.1	
0.276	2.92±0.01		19.9±0.1		2.9±0.1	
0.33	2.994±0.10		19.1±0.1		4.6±0.1	
0.414	2.95±0.10		18.9±0.2		7.4±0.3	
0.436*	0.62±0.04 ^a	2.20±0.03 ^b	15.9±0.0 ^a	19.8±0.1 ^b	3.6±0.2 ^a	6.7±0.1 ^b
0.48*	0.42±0.01 ^a	2.16±0.03 ^b	15.5±0.1 ^a	20.1±0.1 ^b	4.2±0.1 ^a	7.9±0.1 ^b
0.504	1.72±0.20		19.1±0.1		8.8±0.4	
0.572	1.59±0.07		18.8±0.1		8.9±0.1	
0.63	1.28±0.03		18.6±0.2		8.7±0.1	
0.744	1.07±0.06		18.3±0.4		8.4±0.1	
0.820	777.7±76.4		17.8±0.2		7.9±0.3	
0.860	816.8±55.8		17.5±0.1		7.9±0.1	
0.940	1061.1±62.4		18.5±0.2		8.2±0.1	

En las Figuras 29 y 30 se presentan los resultados de la deconvolución de las trazas calorimétricas con 0.436 y 0.480 mg/mL. El análisis para estos sistemas arrojó el mejor

ajuste considerando solamente dos contribuciones (dos picos). Se probaron otros análisis múltiplo, sin embargo, el modelo no concordó con los datos experimentales. Con estos resultados es posible inferir que coexisten dominios con diferente concentración de pinocembrina.

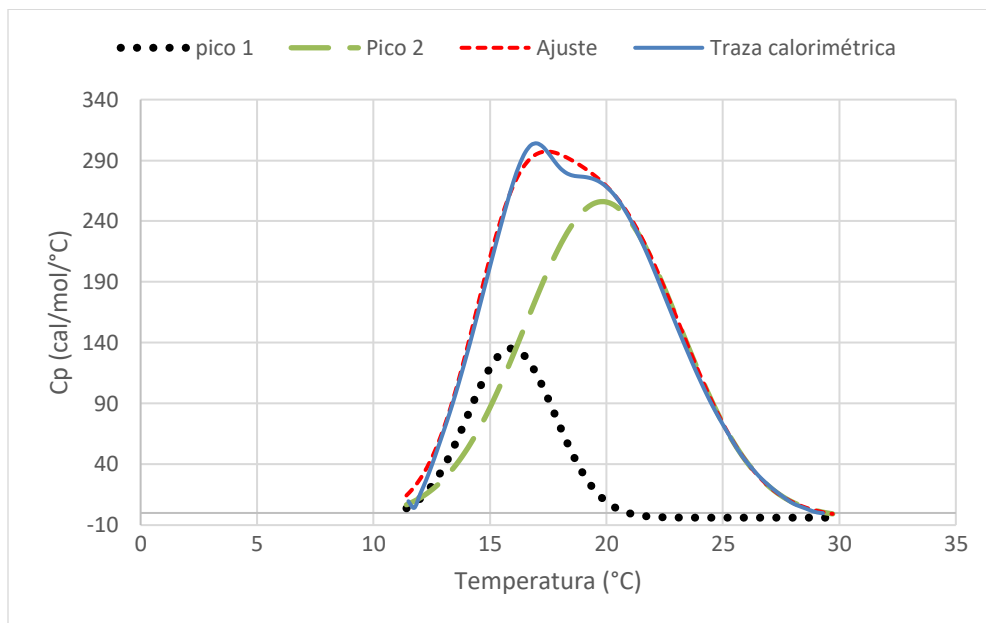


Figura 29. Deconvolución de la traza calorimétrica del sistema DMPC:PINO 0.436 mg/mL.

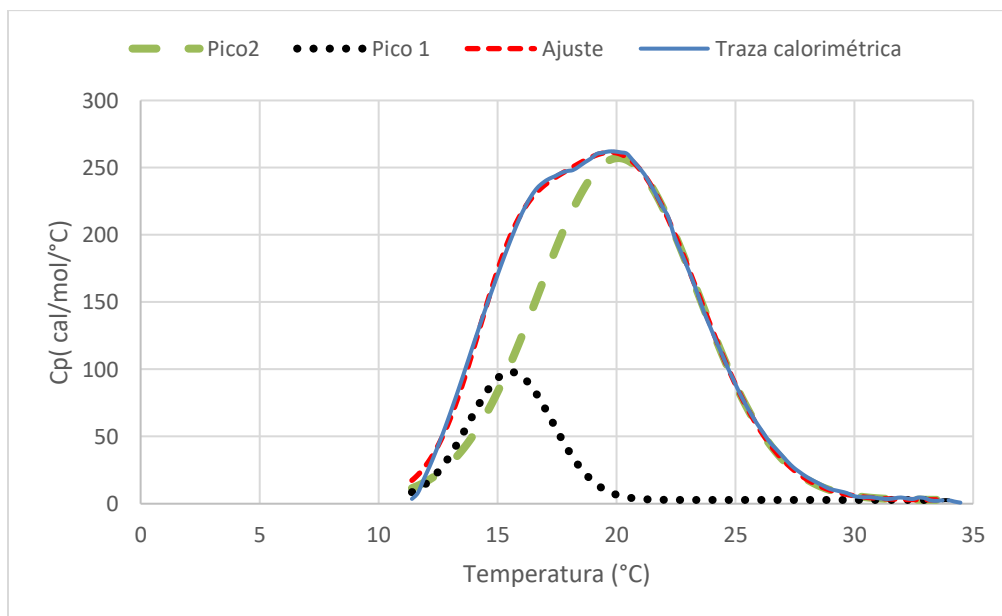


Figura 30. Deconvolución de la traza calorimétrica del sistema DMPC:PINO 0.480 mg/mL.

Si comparamos el sistema con 0.436 mg/mL con el sistema 0.480 mg/mL de pinocembrina (Tabla 14), podemos notar que con una mayor cantidad del aditivo el tamaño del pico 1 disminuye, su entalpía es menor, mientras que el pico 2 se mantiene prácticamente sin cambio; la T_m presenta la misma tendencia.

Tabla 14. Parámetros termodinámicos de los sistemas con 0.436 y 0.480 mg/mL de pinocembrina. El asterisco indica que se realizó una deconvolución de las trazas calorimétricas. (a) pico 1; (b) pico 2.

Pinocembrina (mg/mL)	ΔH_{cal} (kcal/mol)		T_m (°C)		$\Delta T_{1/2}$ (°C)	
0.436*	0.62±0.04 ^a	2.20±0.03 ^b	15.9±0.0 ^a	19.8±0.1 ^b	3.6±0.2 ^a	6.7±0.1 ^b
0.48*	0.42±0.01 ^a	2.16±0.03 ^b	15.5±0.1 ^a	20.1±0.1 ^b	4.2±0.1 ^a	7.9±0.1 ^b

Por otro lado, podemos deducir que el pico 2 es el que contiene la mayor cantidad del aditivo dado que $\Delta T_{1/2}$ es mayor. Si se aumenta la concentración, ambos picos se ensanchan ($\Delta T_{1/2}$ aumenta); sin embargo, el cambio es más drástico en el pico 2 lo cual significa que las moléculas adicionadas no se distribuyen homogéneamente, sino que tienen una preferencia a acumularse en donde haya mayor cantidad de pinocembrina.

En general, la temperatura de transición principal disminuye con la incorporación del aditivo, lo cual significa que la fase líquido-cristalina se favorece y la membrana se vuelve más fluida.

Las moléculas hidrofóbicas, como la pinocembrina, se incorporan en la bicapa modificando significativamente el comportamiento termotrópico de los liposomas y los parámetros termodinámicos. Este efecto depende de la concentración y de la estructura de la molécula huésped, de tal manera que, en un cierto intervalo de temperatura, una cierta cantidad de aditivo modifica la transición de fase [66], abatiendo la T_m , e incluso puede provocar la fluidización irreversible de la membrana a mayores concentraciones [67]. Esta última descripción coincide con los resultados observados al incorporar a los liposomas pinocembrina y colesterol simultáneamente, en estos experimentos ya no ocurre la transición de la fase gel a la fase líquido-cristalina. Las trazas calorimétricas se presentan más adelante.

Si se continúa adicionando pinocembrina el hombro desaparece y el ΔH se abate, tendiendo a un valor constante (Figura 31).

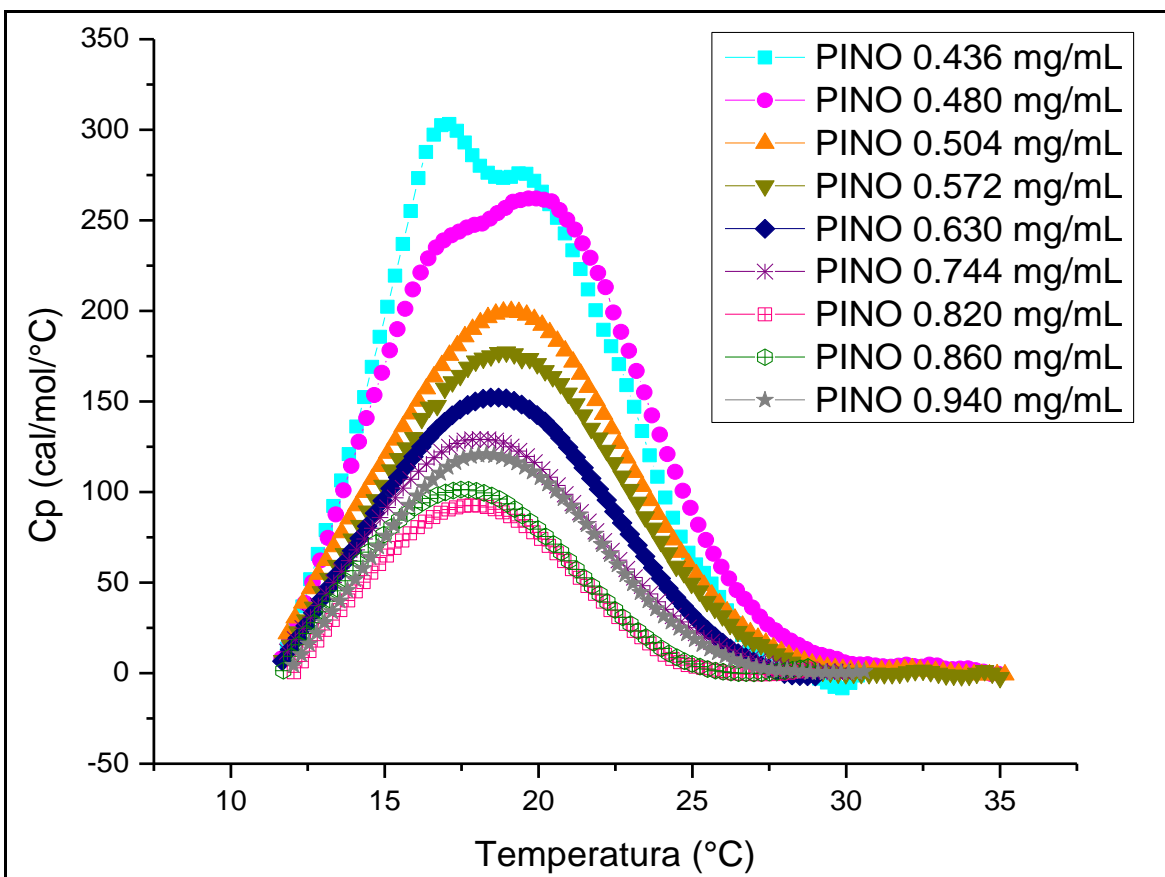


Figura 31. Traza calorimétrica de DMPC en función de diferentes concentraciones de pinocembrina (PINO)

La intercalación de moléculas hidrofóbicas en la membrana provoca una disminución del empaquetamiento entre las cadenas lipídicas y un aumento de hidrofobicidad en la región donde se sitúan, tal como sugieren los estudios de Subczynski *et. al.* [38] con lecitinas y colesterol, dejando un ambiente más favorable para la incorporación de más moléculas, lo cual puede guiar a la formación de dominios con diferente composición. Una explicación para los fenómenos observados es la que se propone a continuación y se esquematiza en la Figura 32:

1. La Figura 32a representa al liposoma puro. A bajas concentraciones de pinocembrina, ésta se distribuye uniformemente en la bicapa (Figura 32b).
2. Al seguir adicionando el aditivo, algunas regiones comienzan a acumular mayor cantidad de pinocembrina, alrededor de 0.276 mg/mL inicia el enriquecimiento de fases, es decir se forman dominios pobres y ricos en pinocembrina por lo que la traza calorimétrica se deforma (Figura 32c).

3. Es posible que el exceso de aditivo en la bicapa conlleve a un cambio de estructura. La aparición de dos picos en la traza calorimétrica sugiere la coexistencia de liposomas esféricos (pobres en pinocembrina) y liposomas tubulares (ricos en pinocembrina), con temperaturas de transición de fase diferentes, como se esquematiza en las Figuras 32d y 32e, respectivamente.

Por encima de 0.744 mg/mL, prácticamente todos liposomas se encuentren homogéneamente dopados, existiendo mayormente estructuras tubulares. Esta transformación se muestra claramente en las micrografías obtenidas por SEM y en el análisis del cambio de entalpía, los resultados se presentan más adelante.

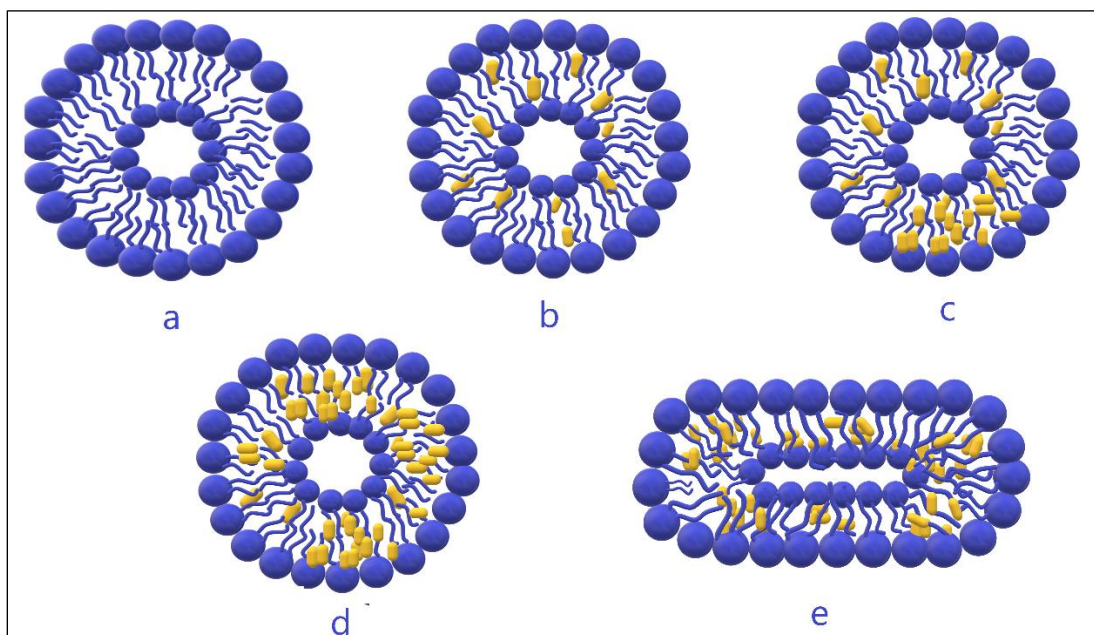


Figura 32. Esquematización de la distribución de pinocembrina en la bicapa lipídica

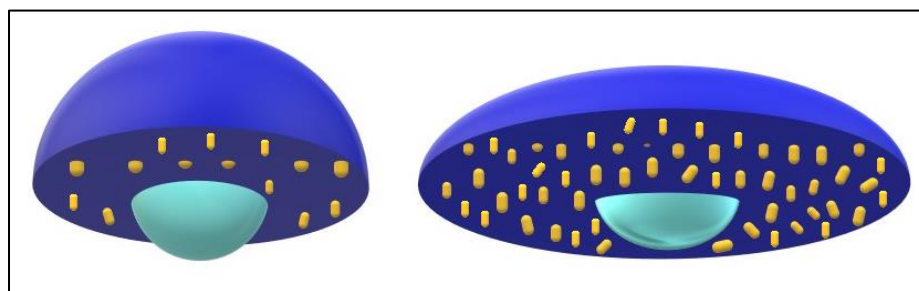


Figura 33. Representación 3D de los liposomas esféricos y tubulares cargados con pinocembrina

Arrowsmith y Oliver utilizaron $\Delta T_{1/2}$ como criterio para determinar la máxima incorporación de aditivo en liposomas de DPPC [68,69]. Taylor menciona que éste es uno de los pocos métodos disponibles para determinar la cantidad de material hidrófobo incorporado en los liposomas [56]. Estos autores coinciden en que una vez que inicia la separación de fases se

ha saturado la membrana. Esta definición puede guiar a la idea de que no es posible adicionar más moléculas huésped en los liposomas. Sin embargo, en este estudio se demuestra que, si se continúa agregando pinocembrina, ésta seguirá incorporándose en los dominios con menores concentraciones del aditivo, lo que conlleva al cambio de estructura de los liposomas. Por lo anterior, podemos definir el inicio de la separación de fases como la concentración crítica del aditivo (ACC, por sus siglas en inglés) y corresponde a la transición de estructuras esféricas a tubulares, como se mostrará en los párrafos siguientes.

En la Figura 34 se grafica $\Delta T_{1/2}$ en función de la concentración de pinocembrina. Se puede observar que el ancho del pico aumenta conforme se incrementa la cantidad de pinocembrina; cuando aparecen dos picos en la traza calorimétrica, $\Delta T_{1/2}$ llega a un valor máximo: el punto ACC; y, posteriormente, se mantiene prácticamente constante con un ligero aumento en la cooperatividad.

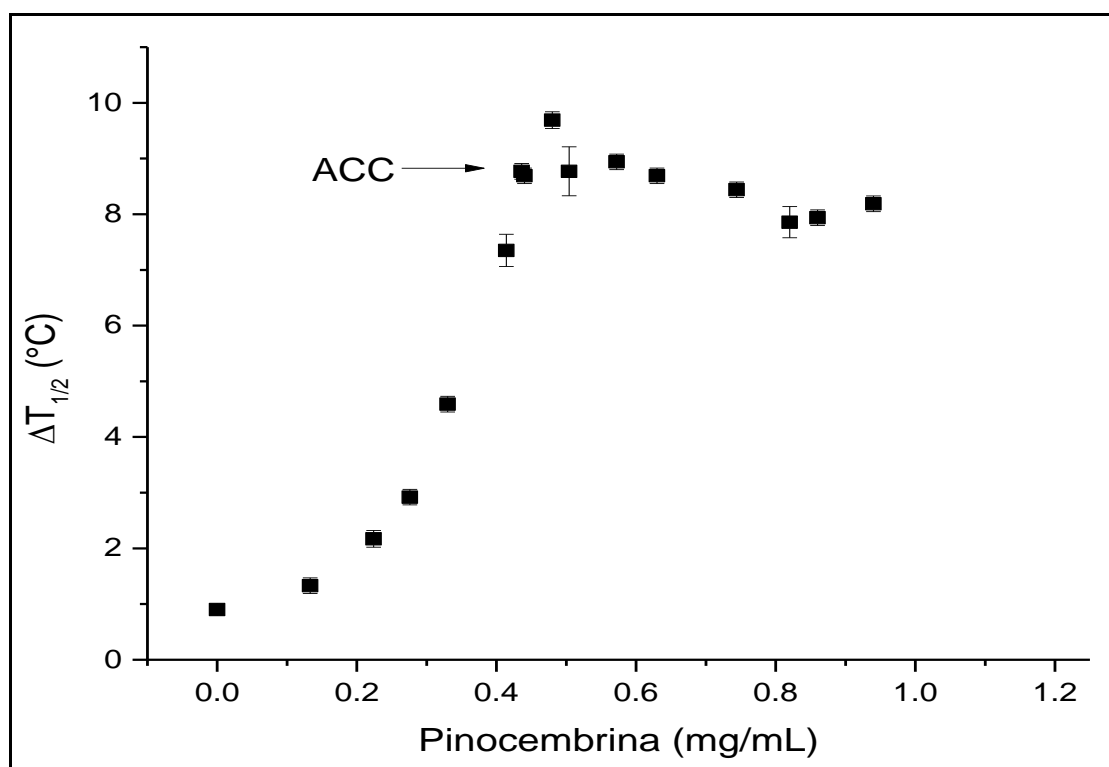


Figura 34. $\Delta T_{1/2}$ en función de la pinocembrina y determinación de la concentración crítica del aditivo (ACC)

El comportamiento de fase de la membrana lipídica tiene implicaciones muy importantes en las propiedades de los liposomas como su estabilidad, fluidez y permeabilidad [45]; conocer la ACC es un paso fundamental en el diseño de sistemas de liberación liposomal, sobre todo si se desea incorporar otro fármaco en la formulación ya que la morfología del liposoma está relacionada con la capacidad de carga de moléculas hidrofóbicas, el vaciado de moléculas hidrofílicas así como el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo [70].

En la Figura 35 se muestra el cambio de entalpía calorimétrica en función de la concentración de pinocembrina, obtenido por DSC. En esta imagen podemos notar que el ΔH_{cal} se abate drásticamente con 0.133 mg/mL; posteriormente, con 0.224 mg/mL, hay una ligera disminución en la entalpía; sin embargo, entre 0.276 y 0.414 mg/mL no hay un cambio significativo en el ΔH_{cal} , lo cual implica que a pesar de que se tiene mayor cantidad de aditivo en la bicapa, las interacciones entre las moléculas son igualmente favorables. Posiblemente se formen estructuras con un mayor grado de empaquetamiento. Estas observaciones podrían confirmar la presencia de dominios ricos en pinocembrina altamente ordenados, tal como lo observaron Wei *et. al.* en estudios con DSPC [44]. Además, podemos suponer la formación de puentes de hidrógeno entre el glicerol y los grupos OH de la pinocembrina, e incluso interacciones pinocembrina-pinocembrina que favorecen este tipo de arreglo.

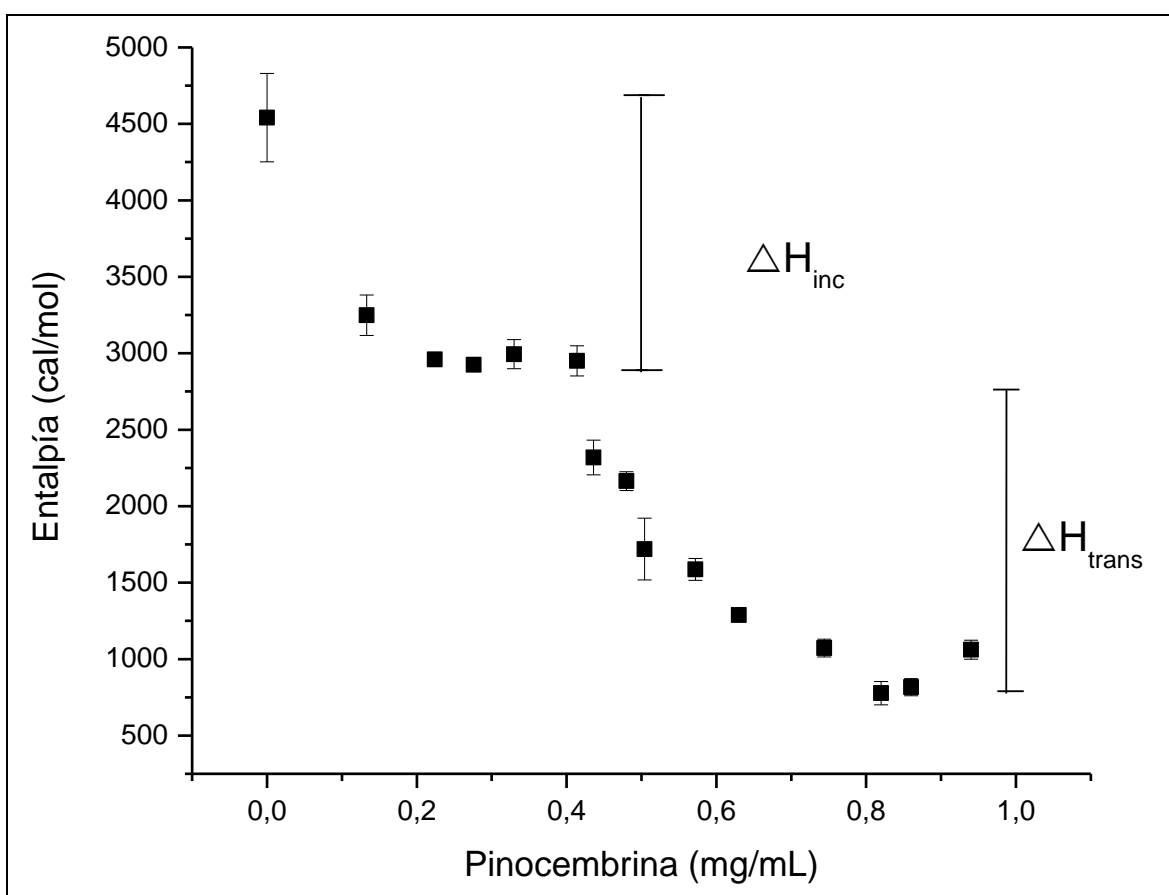


Figura 35. ΔH_{cal} en función de la concentración de pinocembrina

Cuando inicia la separación de fases, 0.436 mg/mL, la entalpía disminuye nuevamente debido a una mayor fluidización de la membrana, la gran cantidad de pinocembrina intercalada en la bicapa disminuye el número de interacciones de van der Waals entre las cadenas de los fosfolípidos.

Por encima de 0.744 mg/mL el ΔH se mantiene prácticamente constante. Es probable que las especies con menor cantidad de pinocembrina comiencen a enriquecerse y las que tenían más pinocembrina alcanzan un valor máximo, lo que significa que ya no es posible incorporar más aditivo. Estos resultados sugieren que las estructuras tubulares tienen una mayor capacidad de carga comparada con los liposomas esféricos.

La Figura 35 muestra dos cambios significativos en los valores de ΔH . La diferencia entre ΔH de DMPC puro y ΔH de DMPC cargado con pinocembrina, representado por el promedio de entalpías de los puntos 0.2 a 0.4 mg/mL, puede atribuirse al efecto que causa la incorporación de pinocembrina en la morfología del liposoma, (ΔH_{inc}). Después de la ACC, se observa nuevamente un cambio suave de ΔH debido a la transición de liposomas esféricos a liposomas tubulares, este fenómeno ya ha sido observada por K. Edwards *et. al.* en liposomas pegilados de fosfatidilcolina cargados con colesterol [71].

En este estudio, el cambio de estructura ocurre en el intervalo de concentraciones de 0.436 a 0.744 mg/mL donde coexisten ambas morfologías, como se muestra en las micrografías SEM que se presentan más adelante. Por encima de 0.744 mg/mL, solamente se observan estructuras tubulares. La diferencia entre el promedio de las entalpías de liposomas tubulares con pinocembrina y el promedio de las entalpías de DMPC esféricos cargados con pinocembrina, representa el ΔH de transición de estructura (ΔH_{trans}).

Tomando en cuenta los criterios descritos anteriormente, el ΔH_{inc} es -1583.5 cal/mol, probablemente este resultado puede deberse a la formación de puentes de hidrógeno entre el glicerol y los hidroxilos de la pinocembrina [72]. Por otro lado, el ΔH_{trans} tiene un valor de -2025.2 cal/mol este valor implica que termodinámicamente es mucho más favorable para las vesículas sufrir un cambio de forma ya que la apropiada distribución lateral y transversal de pinocembrina podría estabilizar regiones de alta curvatura [73].

9.5 Porcentaje de encapsulación

La calorimetría diferencial de barrido reveló la incorporación pinocembrina entre las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos que forman la bicapa lipídica y una fuerte interacción entre estos compuestos. Conocer la cantidad de sustancia incorporadas en la vesícula es esencial para su uso en sistemas de liberación de fármacos, ésta se determinó utilizando filtros para centrífuga Amicon® Ultra de 10 kDa, los cuales vienen dotados de un dispositivo de filtrado que contiene una membrana que permite el paso de materiales de un tamaño menor a 10 kDa y un tubo para centrífuga en donde se colecta el filtrado (Figura 36), como se describió previamente en la sección experimental. En esta parte de la

investigación, se aprovechó la absorción espectroscópica de la pinocembrina a 290 nm, sabiendo que los liposomas no absorben en la misma región (Figura 37).

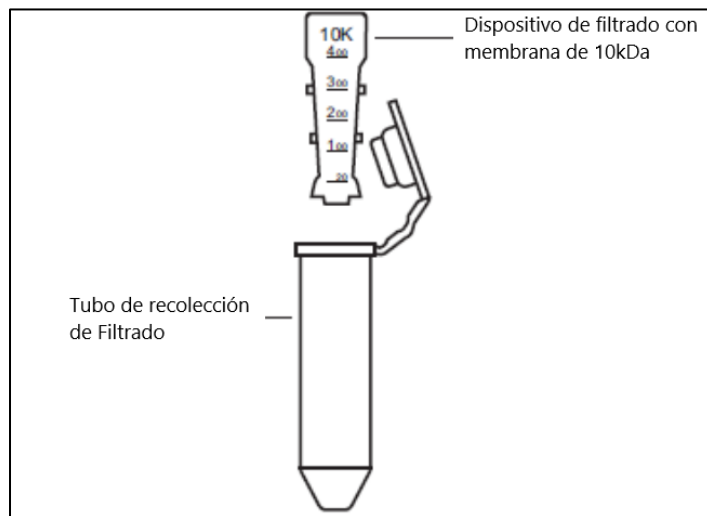


Figura 36. Esquema del filtro para centrifuga Amicon Ultra

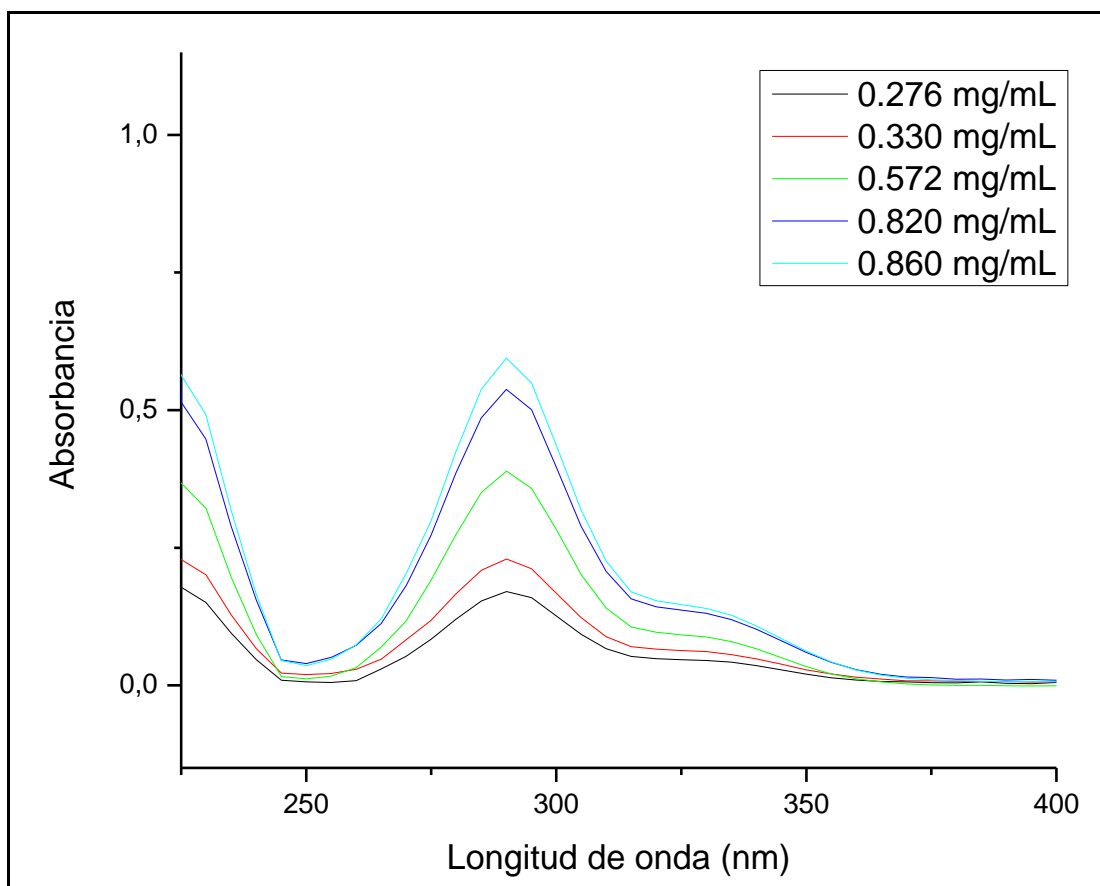


Figura 37. Espectro de absorción de liposomas con diferente concentración de pinocembrina

Adicionalmente, se probaron tres diferentes métodos reportados en la literatura, extrusión, precipitación con protamina y centrifugación, los resultados no se presentan debido a que ninguno arrojó resultados reproducibles.

En la Figura 38 se presentan los resultados del cálculo de eficiencia de incorporación, EI, utilizando la ecuación 1 de la sección caracterización de liposomas. El experimento se realizó por triplicado. Podemos observar una ligera disminución de EI durante la transición de fase; posteriormente, aumenta nuevamente hasta alcanzar un valor máximo de 96%. El valor promedio de EI fue de $89 \pm 5\%$, lo cual comprueba la gran afinidad de la pinocembrina por la bicapa lipídica debido a que es una molécula altamente hidrofóbica pues su solubilidad intrínseca en agua fue menor a $0.2 \mu\text{g/mL}$.

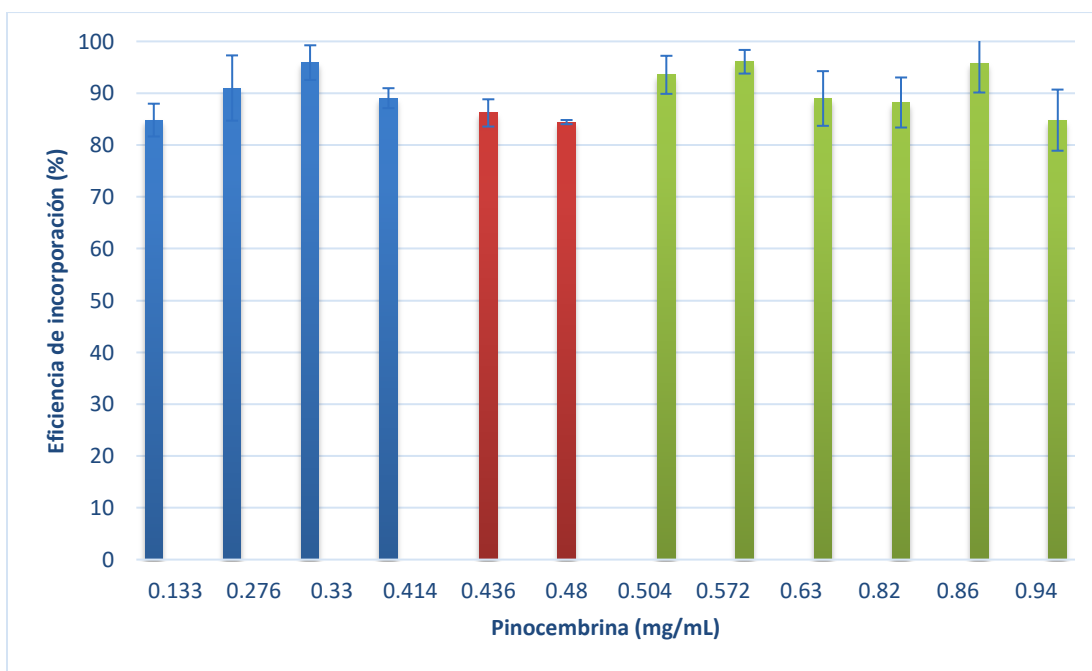


Figura 38. Eficiencia de incorporación de pinocembrina en liposomas de DMPC

9.6 Tamaño de partícula y estabilidad

La Figura 39 es un gráfico típico de la medición de tamaño de partícula obtenida por DLS. En el eje de las abscisas se muestra el tamaño en nm, la escala es logarítmica; mientras que el eje de las ordenadas presenta la intensidad de la luz dispersada por la muestra. Cada suspensión liposomal preparada se midió por triplicado. La imagen presentada corresponde a un sistema DMPC:PINO, las trazas de las 3 mediciones se superponen y únicamente aparece una señal, lo cual indica que se tienen liposomas de alrededor de 100 nm.

El índice de polidispersidad (PDI), proporcionado por el software del equipo, indica qué tan homogénea es la muestra, valores cercanos a cero son resultado de una distribución de tamaños estrecha, es decir que la mayoría de la población se encuentra en un tamaño promedio; valores cercanos a 1 indican la presencia de varias poblaciones con diferentes tamaños [74].

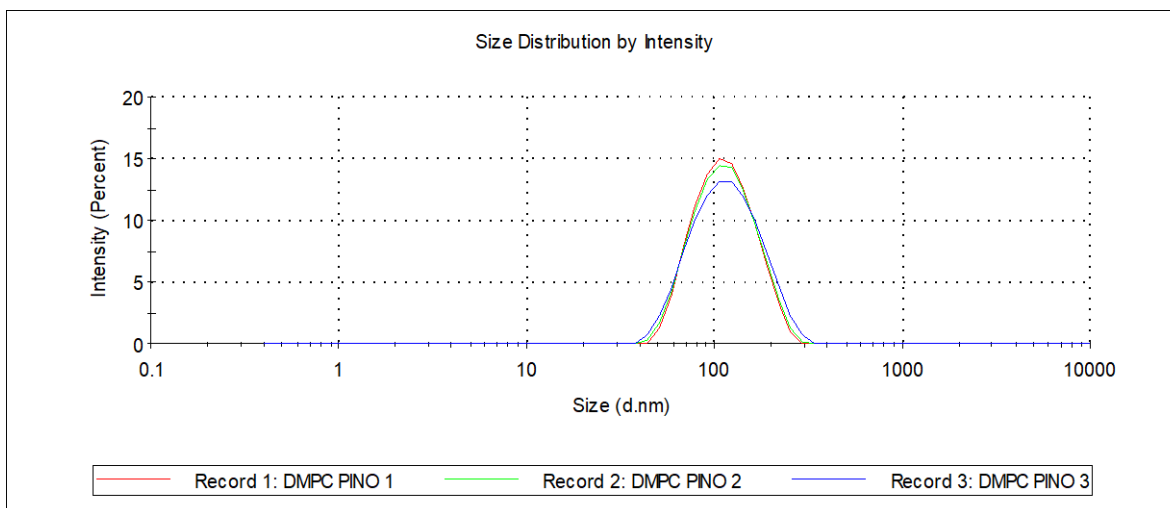


Figura 39. Gráfico típico de DLS en la medición de tamaño de partícula

La estabilidad de los liposomas en disolución se determinó por la aparición de un precipitado visible (Figura 40), las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente. Los resultados de tamaño de partícula, PDI y estabilidad se muestran en la Tabla 15. Los liposomas fueron menos estables al incrementar la cantidad de pinocembrina, excepto con 0.630 mg/mL donde la disolución permaneció homogénea durante 40 días. Esta concentración podría tomarse como referencia en una formulación.

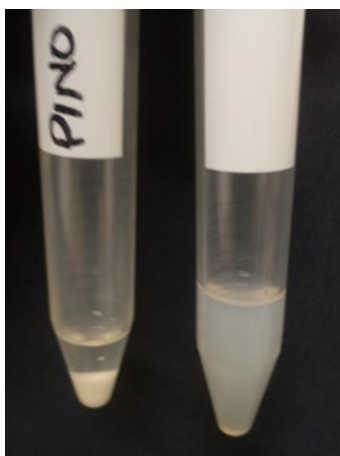


Figura 40. Estabilidad en disolución de los liposomas de DMPC. La imagen de la izquierda muestra un precipitado mientras que la imagen de la derecha corresponde a una disolución liposomal homogénea.

Tabla 15. Resultados de la medición de tamaños de partícula y estabilidad de los liposomas en estudio.

Concentración PINO ($\mu\text{g/mL}$)	Tamaño(nm)	PDI	Estabilidad (días)
0	130 \pm 7	0.125 \pm 0.022	20
0.133	138 \pm 4	0.167 \pm 0.005	10
0.224	109 \pm 2	0.079 \pm 0.019	---
0.276	135 \pm 7	0.115 \pm 0.037	10
0.330	133 \pm 6	0.200 \pm 0.002	15
0.414	146 \pm 12	0.109 \pm 0.023	10
0.436	147 \pm 4	0.096 \pm 0.010	10
0.480	146 \pm 3	0.103 \pm 0.014	8
0.504	126 \pm 5	0.165 \pm 0.003	8
0.572	131 \pm 8	0.130 \pm 0.021	8
0.630	123 \pm 6	0.132 \pm 0.016	40
0.744	140 \pm 13	0.236 \pm 0.023	10
0.820	144 \pm 3	0.083 \pm 0.016	8
0.860	135 \pm 7	0.156 \pm 0.012	10
0.940	107 \pm 5	0.113 \pm 0.024	7

9.7 Microscopía Electrónica

La geometría de las partículas tiene un papel muy importante en la fagocitosis [75], conocer y controlar la estructura de los liposomas es un factor esencial en el diseño de sistemas de liberación de fármacos para evitar o promover la fagocitosis en tejidos celulares a los cuales se dirige el principio activo.

Las Figuras 41 y 42 muestran la morfología de los liposomas puros. Estas imágenes confirman el cambio de estructura de los liposomas al aumentar la cantidad de pinocembrina. Es posible observar estructuras esféricas (círculos azules) y ovoides (círculos rojos) con ciertas deformaciones. Las microscopías de los liposomas que contienen menor cantidad de aditivo muestran liposomas esféricos y alargados (Figura 43); mientras que los liposomas con mayores cantidades del flavonoide son principalmente ovalados (Figura 44-50). A concentraciones de 0.820 y 0.860 mg/mL se presentan estructuras tubulares (Figuras 52-54).

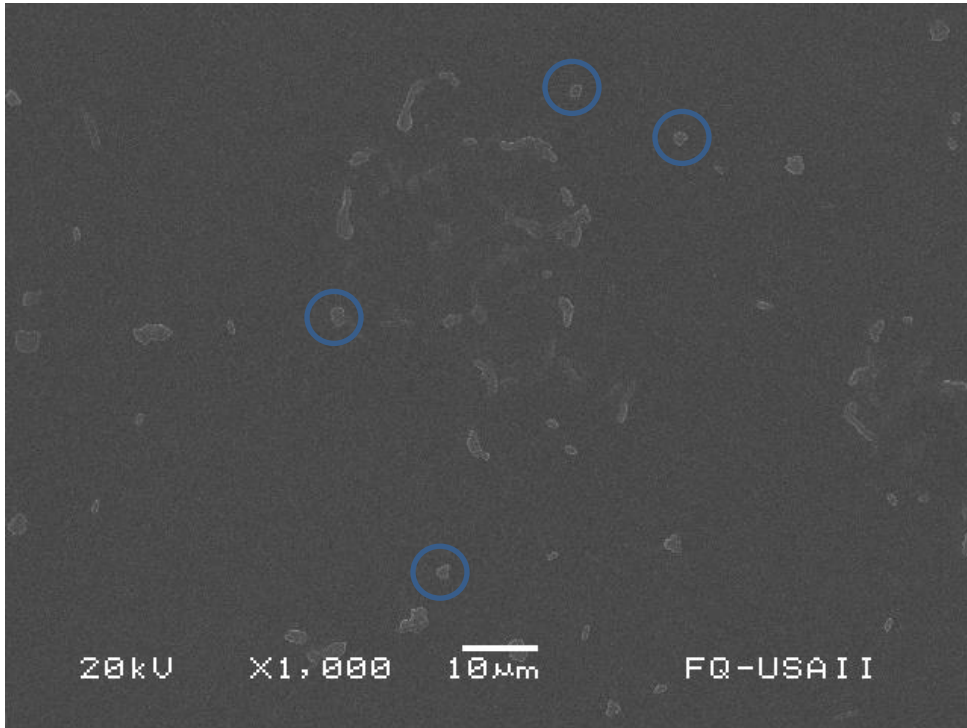


Figura 41. Microscopia de DMPC puro. Los círculos azules encierran estructuras semi-esféricas.

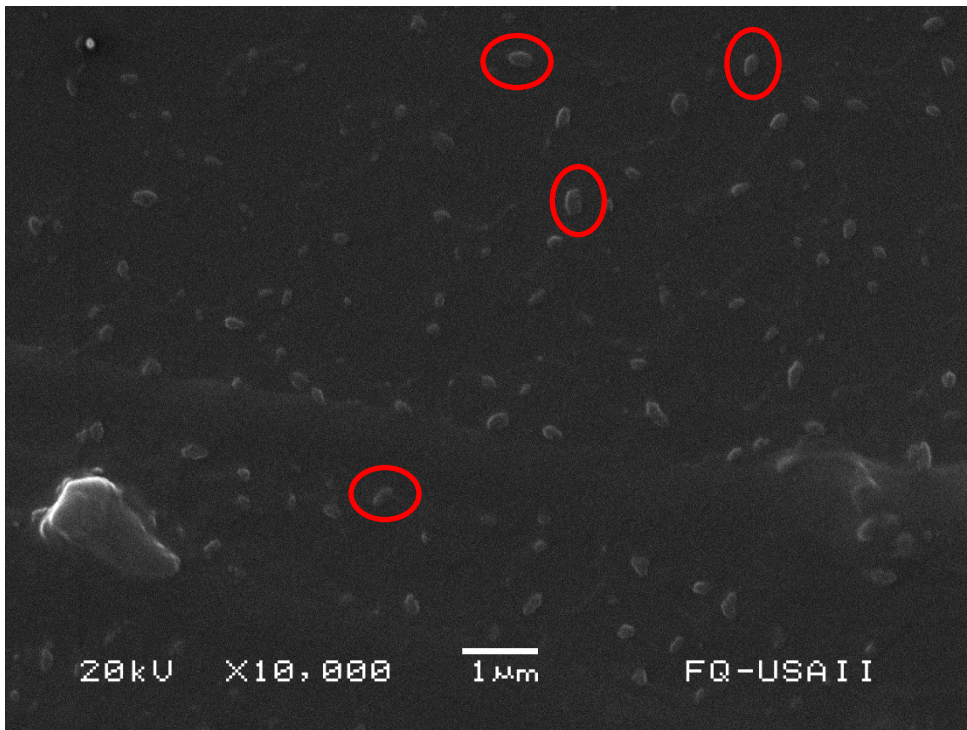


Figura 42. Microscopia de DMPC puro. Los círculos rojos encierran estructuras tubulares

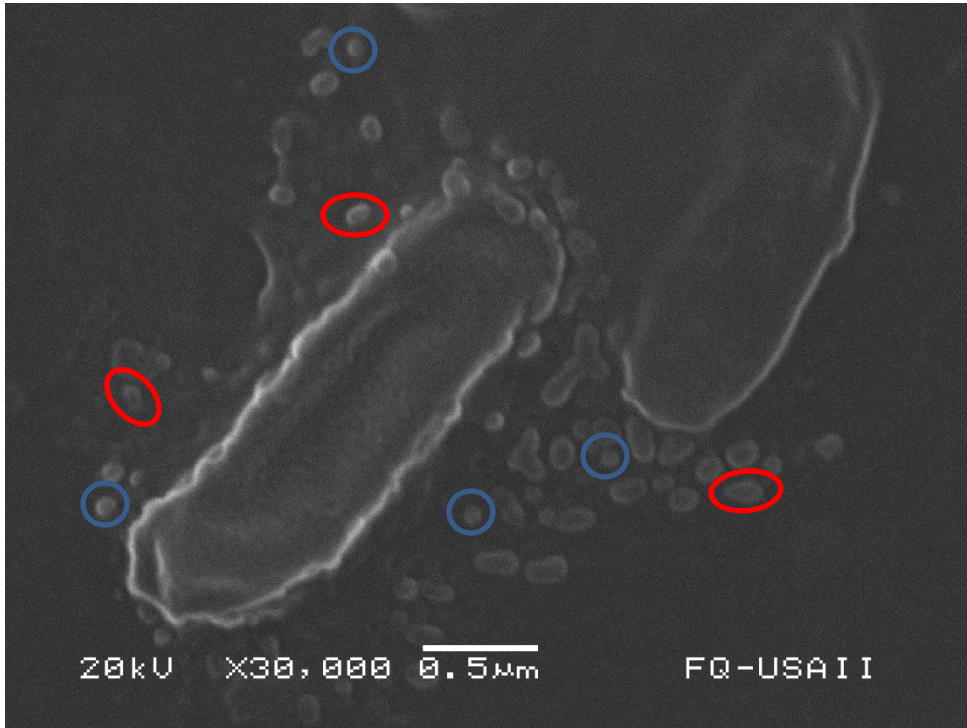


Figura 43. Microscopia de liposomas con 0.230 mg/mL de pinocembrina. Los círculos rojos encierran liposomas tubulares mientras que los azules encierran estructuras esféricas.

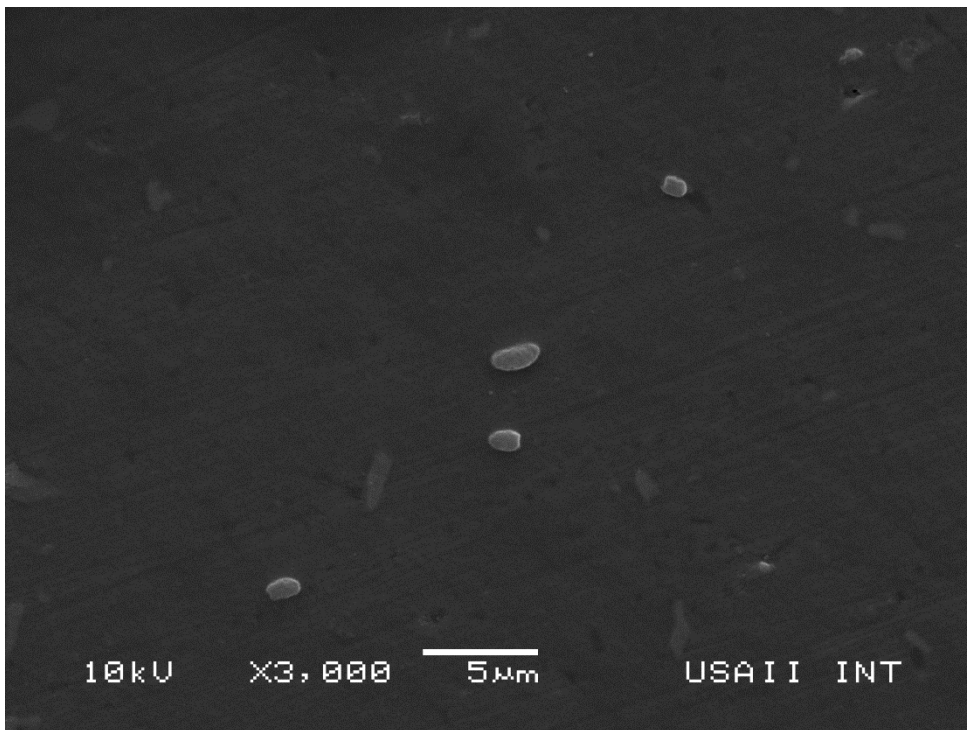


Figura 44. Microscopia de liposomas con 0.480 mg/mL de pinocembrina

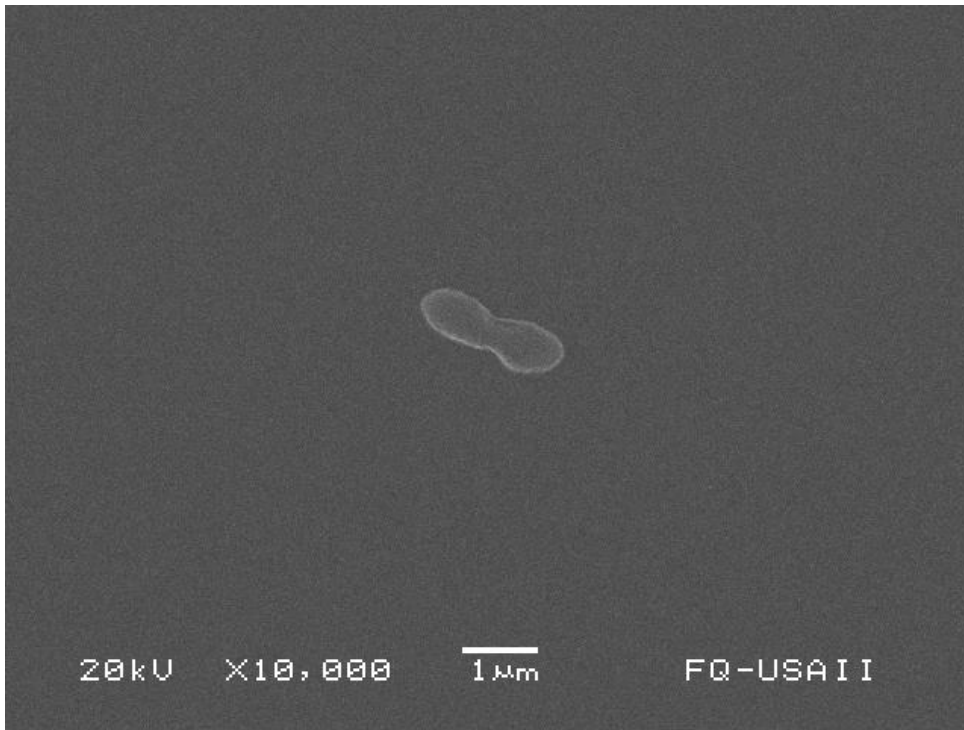


Figura 45. Microscopia de liposomas con 0.504 mg/mL de pinocembrina.

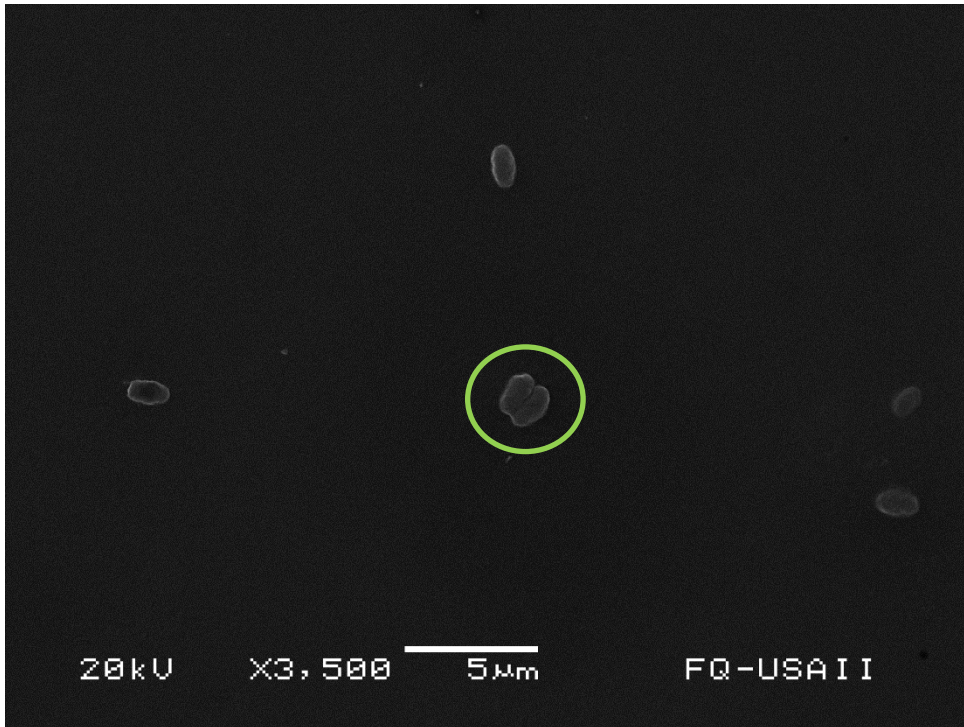


Figura 46. Microscopia de liposomas con 0.560 mg/mL de pinocembrina. Se observan estructuras "pegadas" que pueden estar a punto de fundirse entre ellas (círculo verde).

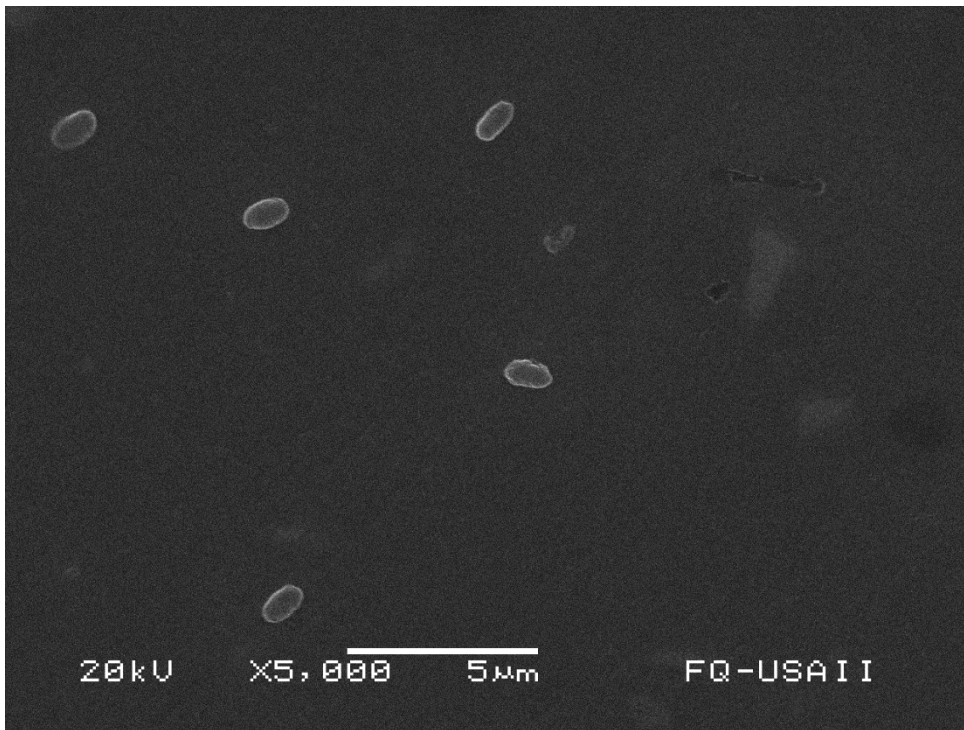


Figura 47. Microscopia de liposomas con 0.572 mg/mL de pinocembrina

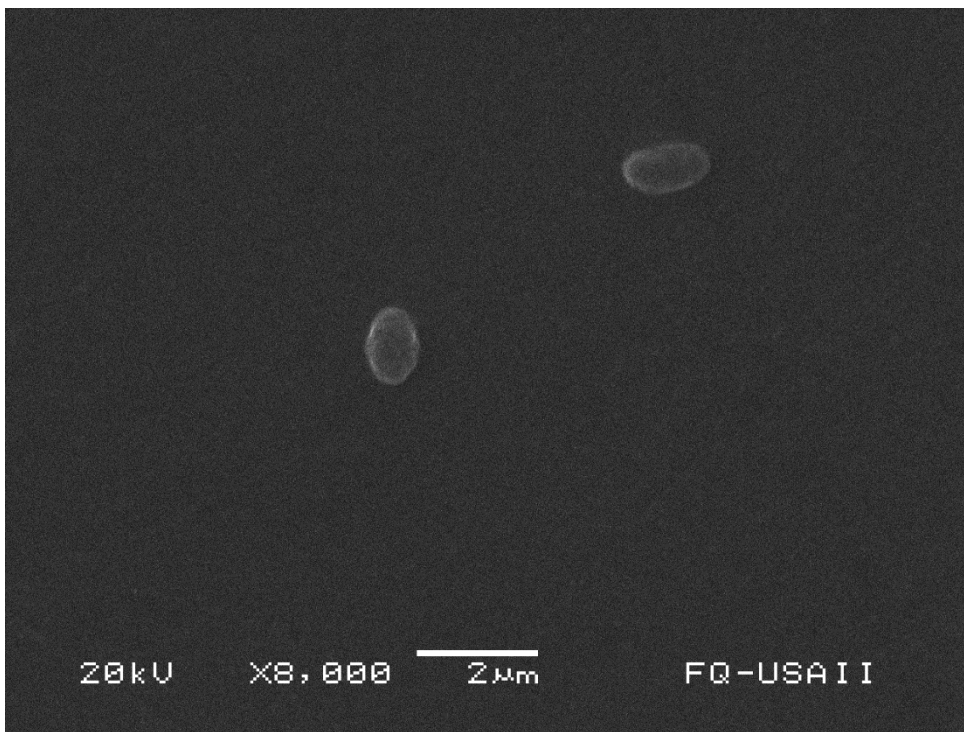


Figura 48. Microscopia de liposomas con 0.572 mg/mL de pinocembrina

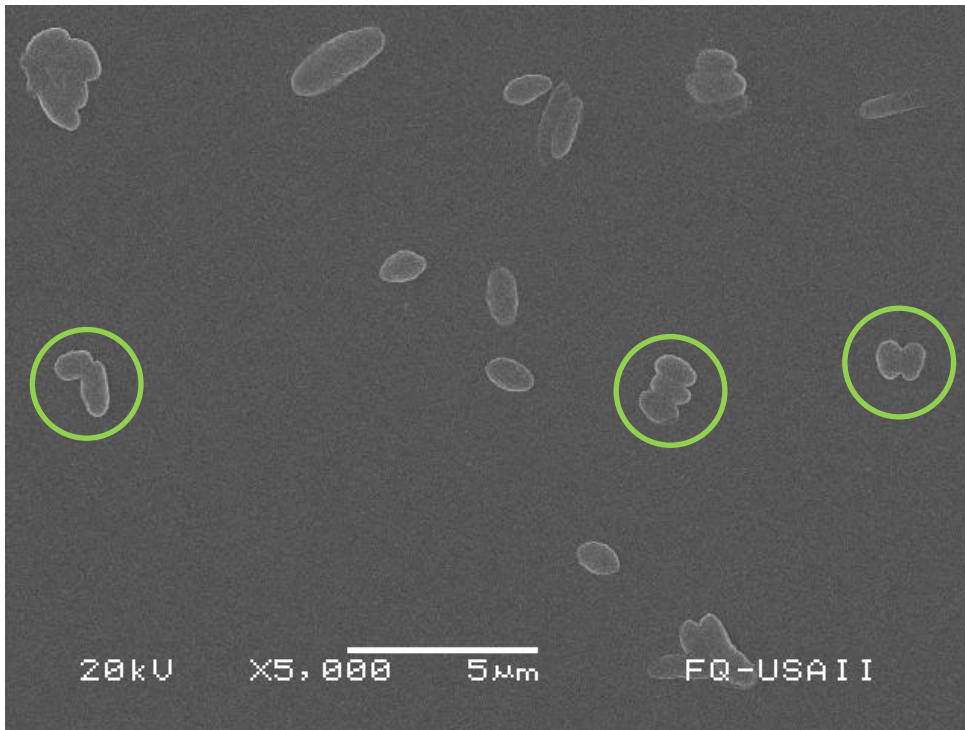


Figura 49. Microscopia de liposomas con 0.572 mg/mL de pinocembrina, se observan estructuras fundidas (círculos verdes)

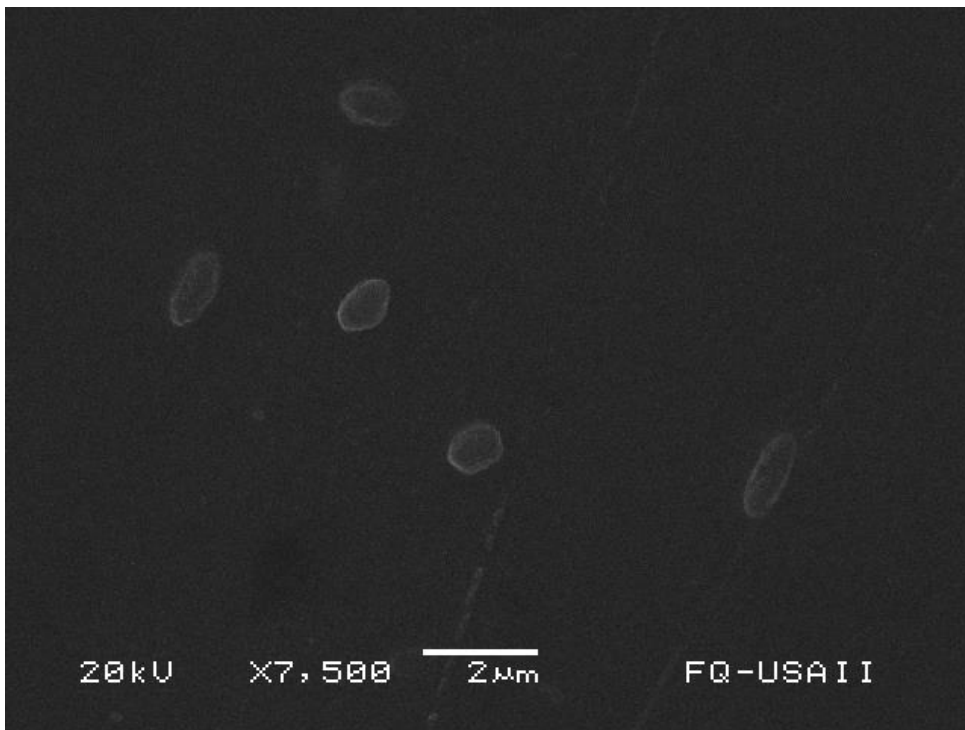


Figura 50. Microscopia de liposomas con 0.640 mg/mL de pinocembrina

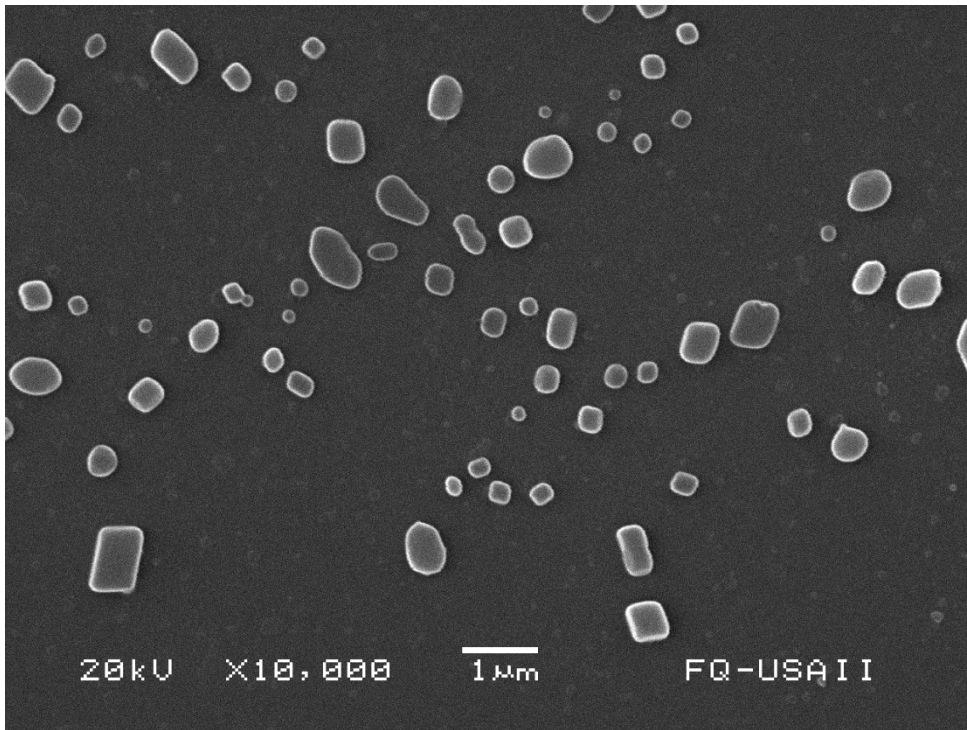


Figura 51. Microscopia de liposomas con 0.820 mg/mL de pinocembrina

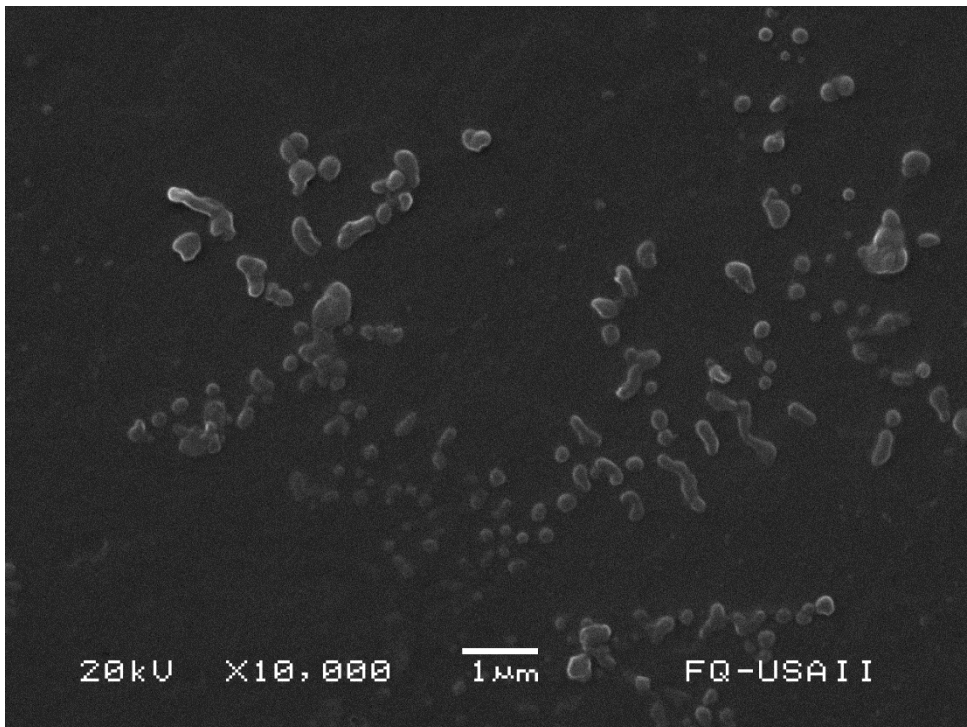


Figura 52. Microscopia de liposomas con 0.820 mg/mL de pinocembrina

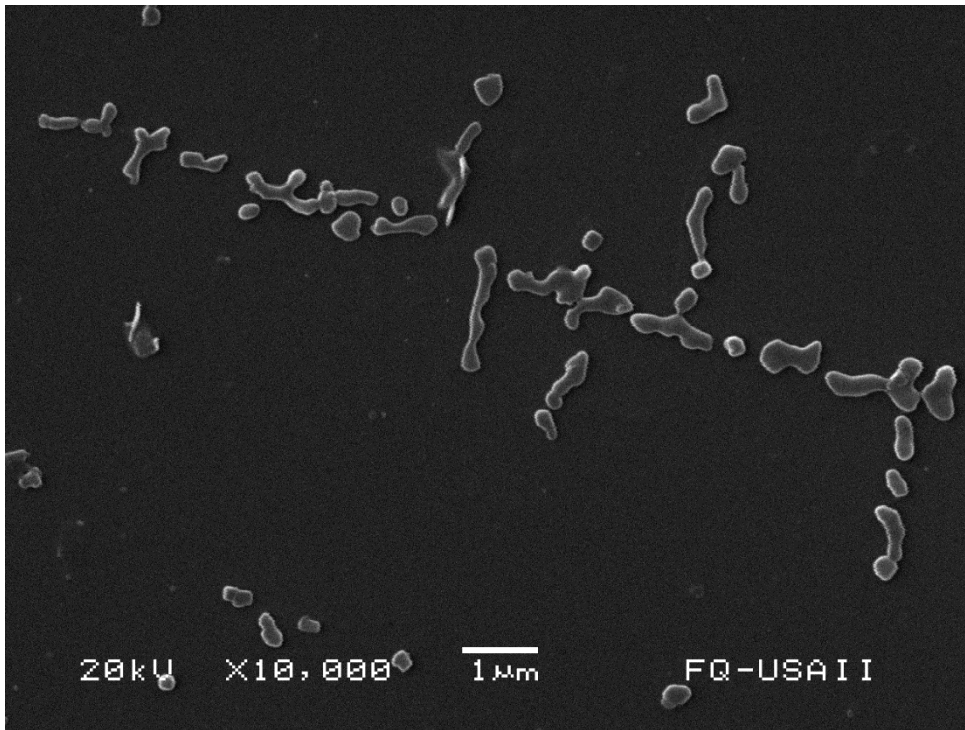


Figura 53. Microscopia de liposomas con 0.860 mg/mL de pinocembrina. Se observan principalmente estructuras tubulares

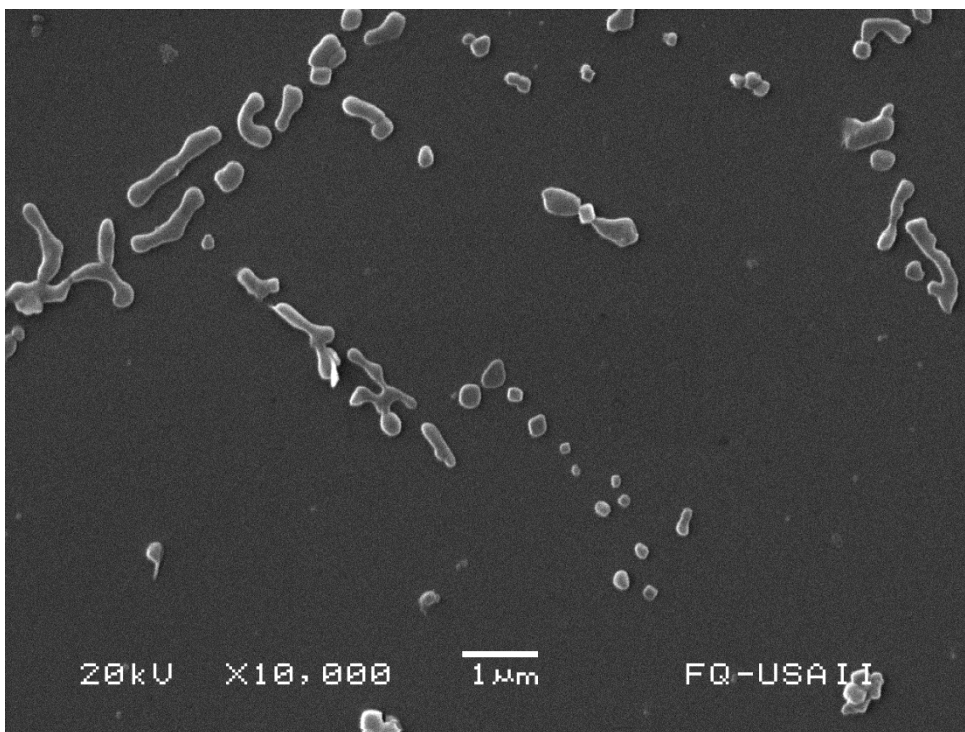


Figura 54. Microscopia de liposomas con 0.860 mg/mL de pinocembrina. Se observan principalmente estructuras tubulares

Los hallazgos presentados en esta investigación pueden aprovecharse para definir el tipo de estructura que se requiere para una formulación en particular. Kusakabe *et. al.* encontraron que los liposomas tubulares cargados con nanopartículas de Fe_3O_4 pueden encapsular más partículas que los esféricos, lo cual significativamente incrementa el nivel de asociación celular *in vitro* [76]. Svetina y Zeks propusieron que el cambio de liposomas esféricos a tubulares puede mejorar la penetración celular debido a que estos últimos son más fácilmente deformables para cruzar poros angostos [77]. Es probable que los liposomas tubulares cargados con altas concentraciones de pinocembrina puedan aumentar la actividad y biodisponibilidad de esta molécula. Estudios adicionales *in vitro* e *in vivo* son necesarios para entender completamente el mecanismo de liberación.

Las estructuras tubulares encontradas pueden ser originadas si los liposomas con diferentes concentraciones de pinocembrina se funden entre ellos, tal como se observa en algunas microscopías (Figuras 46, 49 y 54). Para probar esta hipótesis se propuso un experimento en el cual se mezclan disoluciones de liposomas vacíos con liposomas cargados con pinocembrina y medir su comportamiento térmico por DSC. La forma de la traza puede demostrar que la fusión entre ellos se lleva a cabo y además podría ser un probable mecanismo de liberación.

Se preparó una disolución de DMPC 10 mM y una disolución DMPC:PINO 0.448 mg/mL, se mezclaron en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1. Las disoluciones originales y las mezclas resultantes se midieron en el DSC.

En la Figura 55 se muestran las trazas calorimétricas obtenidas. La traza calorimétrica de DMPC puro corresponde a un pico agudo y angosto mientras que la traza de DMPC:PINO 0.480 mg/mL presenta dos picos, como se ha observado en los experimentos previos. La Figura 56 corresponde a los mismos resultados sin DMPC puro, para ampliar la escala. Como puede observarse, entre mayor es la proporción de liposomas vacíos, las trazas calorimétricas son más parecidas a los sistemas preparados con poca cantidad de pinocembrina en los experimentos de saturación (figura 28), estos resultados demuestran que los liposomas funden entre ellos dando como resultando membranas lipídicas con menor concentración de pinocembrina.

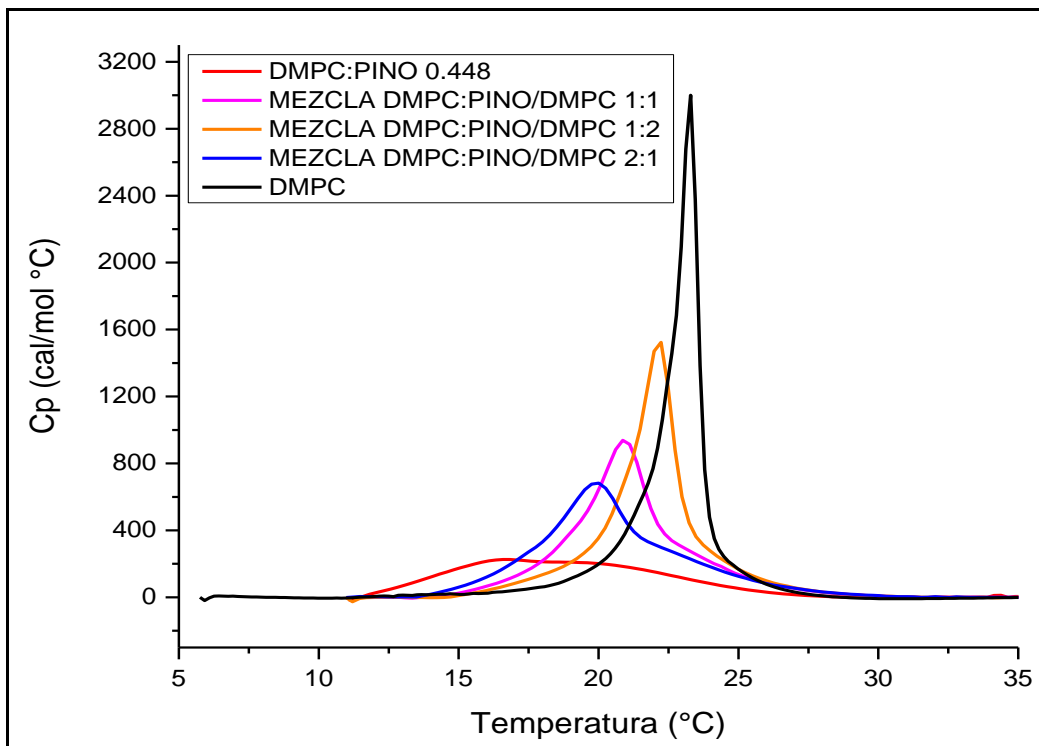


Figura 55. Trazas calorimétricas de la mezcla de liposomas vacíos y cargados con 0.448 mg/mL de pinocembrina.

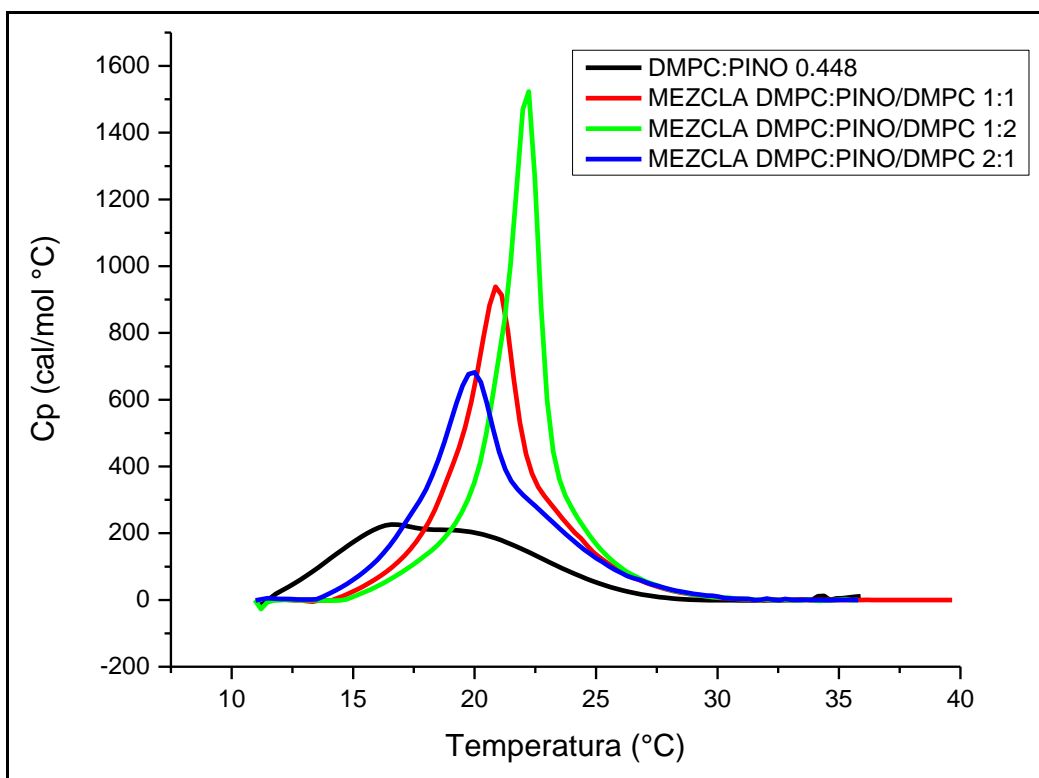


Figura 56. Trazas calorimétricas de la mezcla de liposomas vacíos y cargados con 0.448 mg/mL de pinocembrina.

9.8 Incorporación de colesterol

La adición de colesterol en los liposomas ha sido una estrategia muy utilizada para mejorar las características de la formulación. El contenido de este esteroide en otras investigaciones va desde un 10 al 50% [37]. Algunos estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que una proporción molar 4:1 fosfolípido colesterol favorece la estabilidad de los liposomas por lo cual se decidió conservar esta proporción.

A continuación, se presentan los liposomas formados por fosfolípido puro (DMPC), con pinocembrina (DMPC:PINO), y con pinocembrina y colesterol (DMPC:PINO:CH). Las concentraciones de los sistemas estudiados se muestran en la Tabla 16. Los termogramas y los parámetros termodinámicos de estos sistemas se encuentran en la Figura 57 y en la Tabla 17, respectivamente.

Tabla 16. Datos experimentales de los sistemas liposomales DMPC:PINO y DMPC:PINO:CH en agua milli-Q

Sistema	DMPC:PINO		DMPC:PINO:CH		
	Fosfolípido	Pinocembrina	Fosfolípido	Pinocembrina	Colesterol
Reactivo					
Cantidad (g)	0.03416	0.00315	0.03490	0.00306	0.00750
Concentración (mM)	10.1	2.5	10.5	2.4	3.9
Concentración (mg/mL)	6.83	0.63	6.98	0.61	1.5
% masa	≈92	≈8	≈77	≈7	≈16

Tabla 17. Parámetros termodinámicos de los sistemas con pinocembrina y colesterol en agua milli-Q

SISTEMA	ΔH_{cal} (kcal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
DMPC	4.54±0.29	23.27±0.02	0.90±0.10
DMPC:CH	1.68±0.01	26.02±0.13	11.99±0.10
DMPC: PINO	1.29±0.03	18.59±0.16	8.69±0.14
DMPC:PINO:CH	0.24±0.04	22.70±0.84	13.12±0.3.37

Como puede observarse en la Figura 57, tanto la pinocembrina como el colesterol provocan un abatimiento en la entalpía. La combinación de ambos aditivos provoca la completa fluidización de la membrana por lo cual, en la traza calorimétrica, se observa prácticamente una línea recta y el ΔH_{cal} tiende a cero.

A diferencia de la pinocembrina, el colesterol produce cierta rigidez en la bicapa, la T_m se recorre a mayores valores. Ambas moléculas disminuyen la cooperación de la transición de fase significativamente.

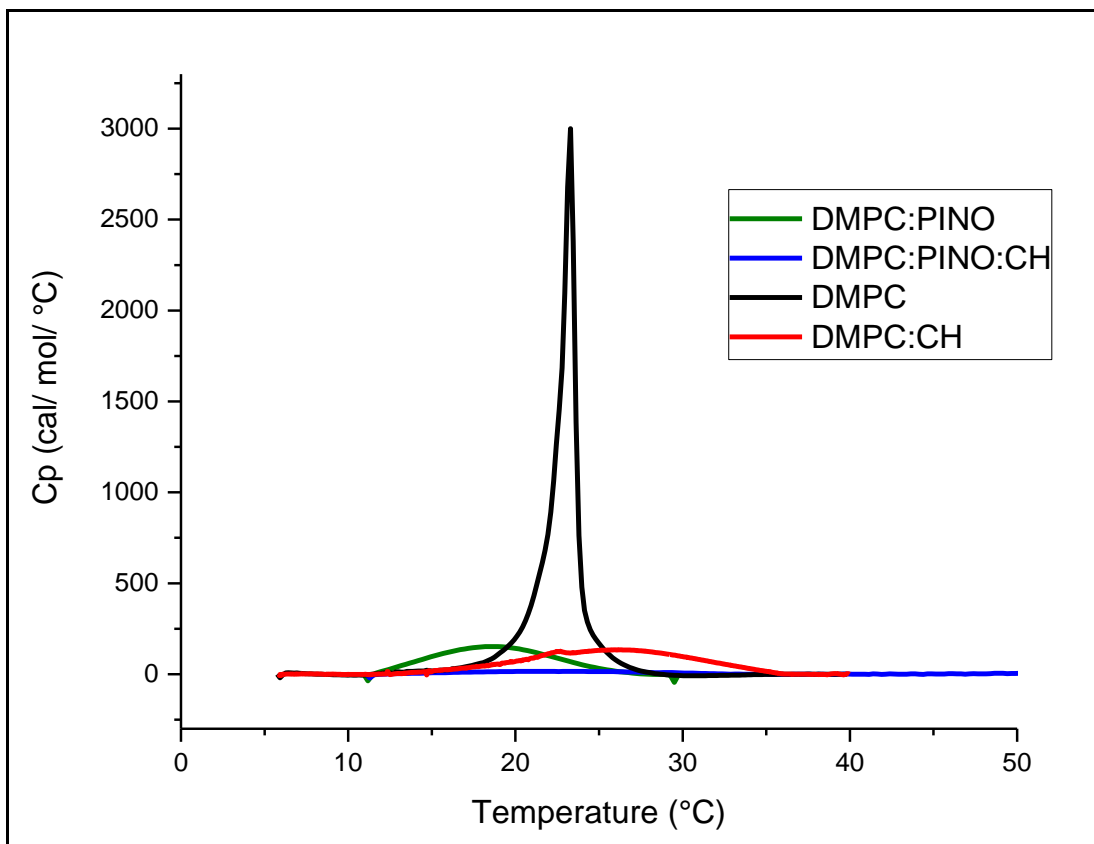


Figura 57. Traza calorimétrica de los sistemas liposomasles de DMPC con pinocembrina y colesterol preparados en agua milli-Q

La distribución de tamaño de los liposomas cambia durante el almacenaje. Los liposomas tienden a fusionarse y crecer, formando vesículas más grandes, que es un estado termodinámicamente más favorable [78].

El potencial Z es una medida de la estabilidad de las partículas coloidales. Valores absolutos iguales o mayores a 30 mV apuntan a una gran estabilidad. Midiendo este parámetro es posible predecir la estabilidad de los sistemas coloidales; es decir, cuáles de los liposomas preparados permanecerán más tiempo en disolución.

En la Tabla 18 se registraron los resultados de potencial Z, tamaño de partícula y polidispersidad (PDI) medidos por DLS. De acuerdo con los valores obtenidos, el sistema más estable es el que contiene únicamente pinocembrina.

Tabla 18. Potencial Z, tamaño y estabilidad de los sistemas liposomales de DMPC con pinocembrina y colesterol

Sistema	Potencial Z	Tamaño (nm)	PDI	Estabilidad (días)
DMPC	-1.14	105.9 ± 1.8	0.114	21
DMPC:CH	-1.13	118.9±0.2	0.097	10
DMPC:PINO	-7.82	123.1±0.6	0.122	20
DMPC:PINO:CH	-3.09	109.5±0.74	0.085	20

El tamaño de partícula se monitoreó durante los siguientes 20 días o hasta la aparición de un precipitado o cambios visibles en la apariencia de la suspensión (Tabla 19), estas mediciones se hicieron con la finalidad de conocer si la estabilidad de los sistemas en estudio está relacionada con la fusión o floculación de los liposomas. Los resultados se contrastaron con las predicciones efectuadas al medir potencial Z.

Tabla 19. Mediciones de tamaño de partícula de los sistemas con pinocembrina y colesterol en función del tiempo

TIEMPO	DMPC	DMPC:CH	DMPC:PINO	DMPC:PINO:CH
1	105.9 ± 1.8	118.9 ± 0.2	103.2 ± 6.1	109.8 ± 0.74
5	108.5 ± 0.3	114.9 ± 0.6	111.1 ± 6.9	105.8 ± 8.5
10	105.9 ± 0.6	119.7 ± 1.4	118.8 ± 3.8	106.7 ± 2.6
15	105.7 ± 1.6	119.3 ± 1.4	121.3 ± 9.3	113.9 ± 8.4
20	***	***	118.5 ± 3.3	113.3 ± 6.0

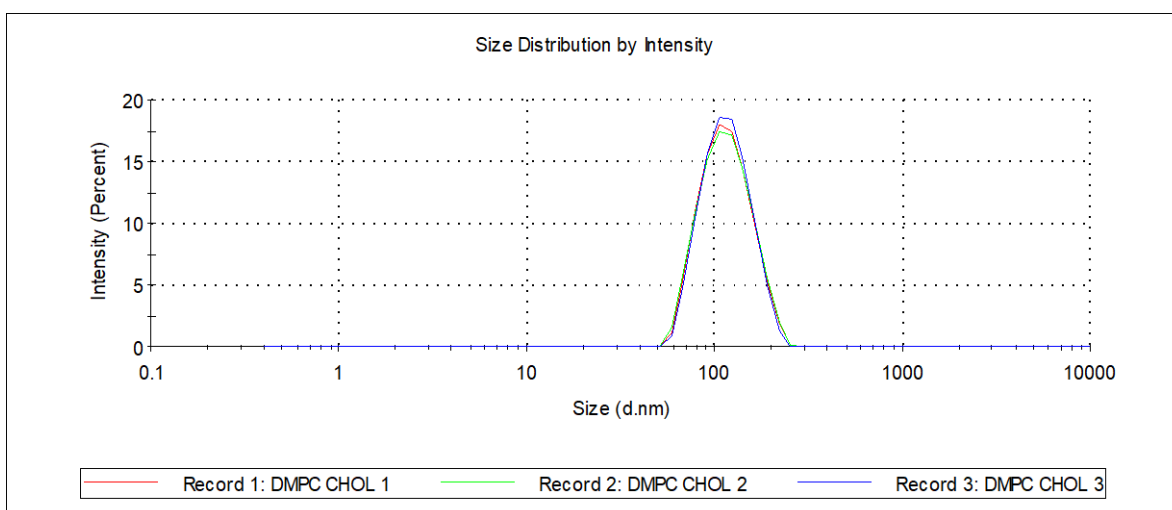


Figura 58. Medición de tamaño de partícula de los sistemas DMPC:PINO en agua milli-Q

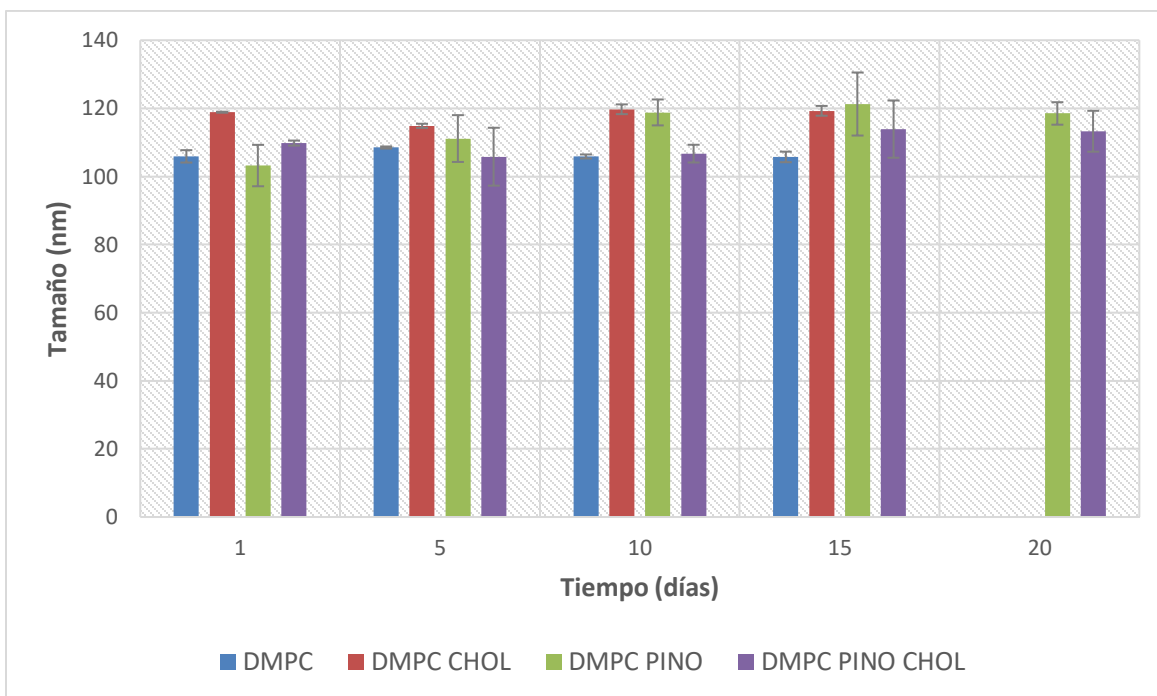


Figura 59. Estabilidad en disolución de los liposomas hidratados en agua milli-Q. Tamaño en función del tiempo

De acuerdo con las mediciones registradas en la figura 59, los sistemas más estables en agua milli-Q fueron DMPC:PINO y DMPC:PINO:CH, este resultado concuerda con la medida del potencial Z ya que estas suspensiones tienen los valores absolutos mayores.

Se puede notar un ligero incremento en el tamaño de los liposomas al día 20 respecto a las disoluciones recién preparadas, esta observación podría estar asociada a la fusión de los liposomas.

9.9 Liposomas con colesterol en medio amortiguado

Se preparó una disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 para realizar los experimentos que se describen a continuación. Se eligió este medio debido a que el pH fisiológico es muy similar.

En la Tabla 20 se muestran las cantidades utilizadas en cada formulación, así como el cálculo de las concentraciones. En la Tabla 21 se presentan los parámetros termodinámicos T_m , $T_{1/2}$ y ΔH_{cal} de los sistemas liposomales hidratados en PBS.

Tabla 20. Datos experimentales de los sistemas liposomales DMPC, DMPC:PINO y DMPC:PINO:CH preparados en medio amortiguado de fosfatos (PBS)

Sistema (PBS)	Reactivo	Cantidad (g)	Concentración (mM)	Concentración (mg/mL)
DMPC	Fosfolípido	0.0340	10.03	6.80
DMPC:CH	Fosfolípido	0.0680	10.03	6.80
	Colesterol	0.013	3.36	1.30
DMPC:PINO	Fosfolípido	0.03402	10.04	6.80
	Pinocembrina	0.00305	2.65	0.61
DMPC:PINO:CH	Fosfolípido	0.03435	10.13	6.87
	Pinocembrina	0.00313	2.44	0.63
	Colesterol	0.00685	3.54	1.37

Tabla 21. Parámetros termodinámicos de los sistemas con pinocembrina y colesterol hidratados en buffer fosfatos

SISTEMA	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
DMPC	3.00±0.14	23.43±0.08	1.18±0.14
DMPC:CH	2.25±0.23	29.88±0.34	19.57±0.75
DMPC:PINO	1.15±0.05	18.99±0.08	9.12±0.14
DMPC:PINO:CH	0.52±0.04	24.24±1.02	18.15±0.39

La Figura 60, muestra los cambios en la traza calorimétrica al incorporar diferentes componentes a la membrana. Una vez más se comprueba que tanto la pinocembrina como el colesterol pueden insertarse entre los fosfolípidos que forman la bicapa disminuyendo las interacciones entre ellos hasta un punto en el que ya no hay transición gel a líquido-cristalino; es decir, la vesícula permanece en el estado fluido. La pinocembrina provoca un mayor abatimiento de la entalpía de transición mientras que el colesterol favorece la fase líquido-cristalina por lo que podemos concluir que el colesterol se acomoda de una manera más eficiente en la bicapa, ésta podría ser la razón por la que la membrana se rigidiza.

La pinocembrina provoca un mayor abatimiento de la entalpía de transición y recorre la T_m a valores menores; mientras que el colesterol favorece la fase líquido-cristalina porque la T_m se desplaza a la derecha y es menor el cambio en la entalpía. Podemos concluir que el colesterol se acomoda de una manera más eficiente en la bicapa, ésta podría ser la razón por la que la membrana del liposoma se rigidiza; es decir, aumenta el estado de orden de

los fosfolípidos [40]. Este fenómeno también ha sido observado en formulaciones que contienen DPPC/paclitaxel/colesterol, en las cuales el colesterol favorece un sistema más condensado [65].

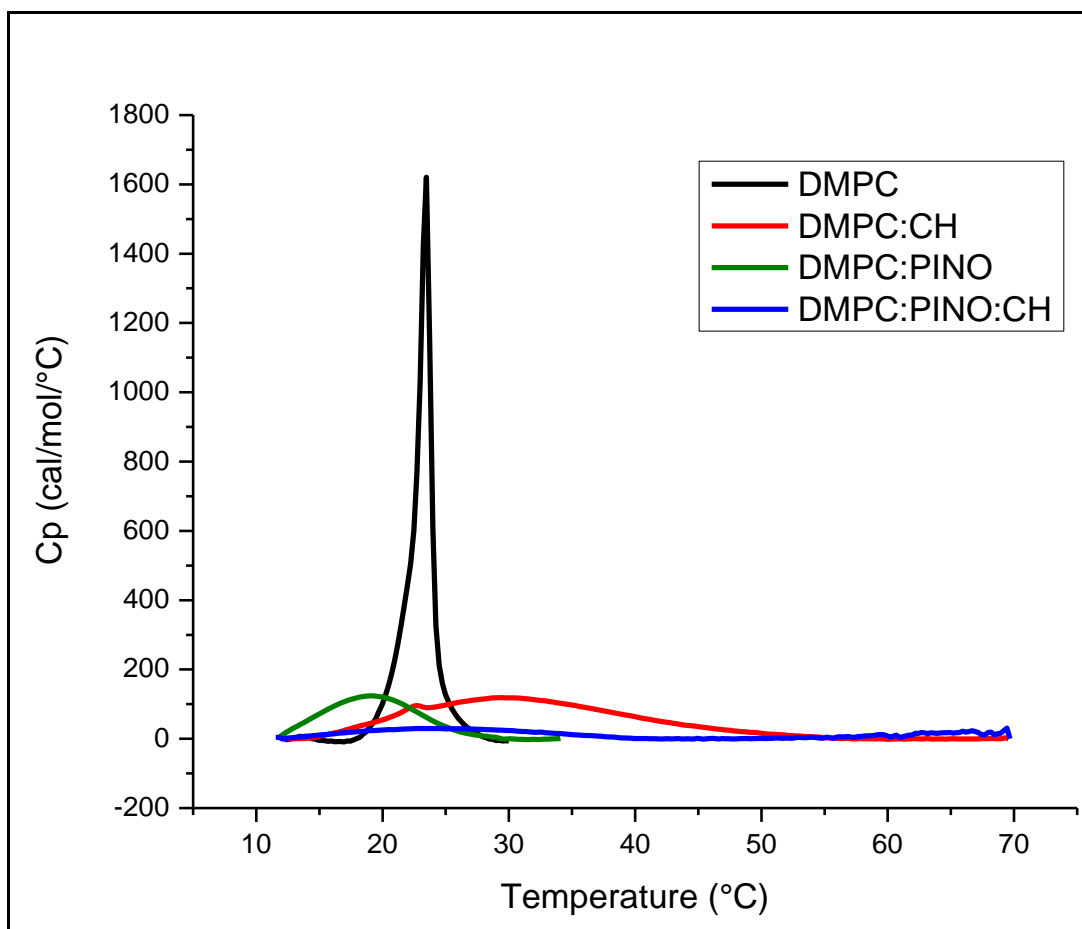


Figura 60. Trazas calorimétricas de los sistemas que contienen pinocembrina y colesterol

Al igual que en agua milli-Q, la estabilidad en disolución, tamaño de partícula y potencial Z se determinaron en un Zetasizer Nano. Los resultados aparecen en la Tabla 22.

Tabla 22. Tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad de los sistemas preparados en medio amortiguado

Sistema	Potencial Z	Tamaño (nm)	PDI
DMPC	-1.50±0.48	97.71±2.85	0.181
DMPC:CH	2.99±0.16	137.50±2.43	0.104
DMPC:PINO	7.65±0.38	120.40±2.56	0.107
DMPC:PINO:CH	0.74±0.05	136.00±5.59	0.195

En pH 7.4, el sistema más estable fue DMPC:PINO superando los 40 días de estabilidad en disolución; el resultado coincide con la medición de potencial Z, Figura 61. En estos sistemas no se observa un cambio significativo en el tamaño del liposoma con respecto al tiempo, tal vez esta sea la razón por la que se retrase la floculación, debido a la presencia de sales.

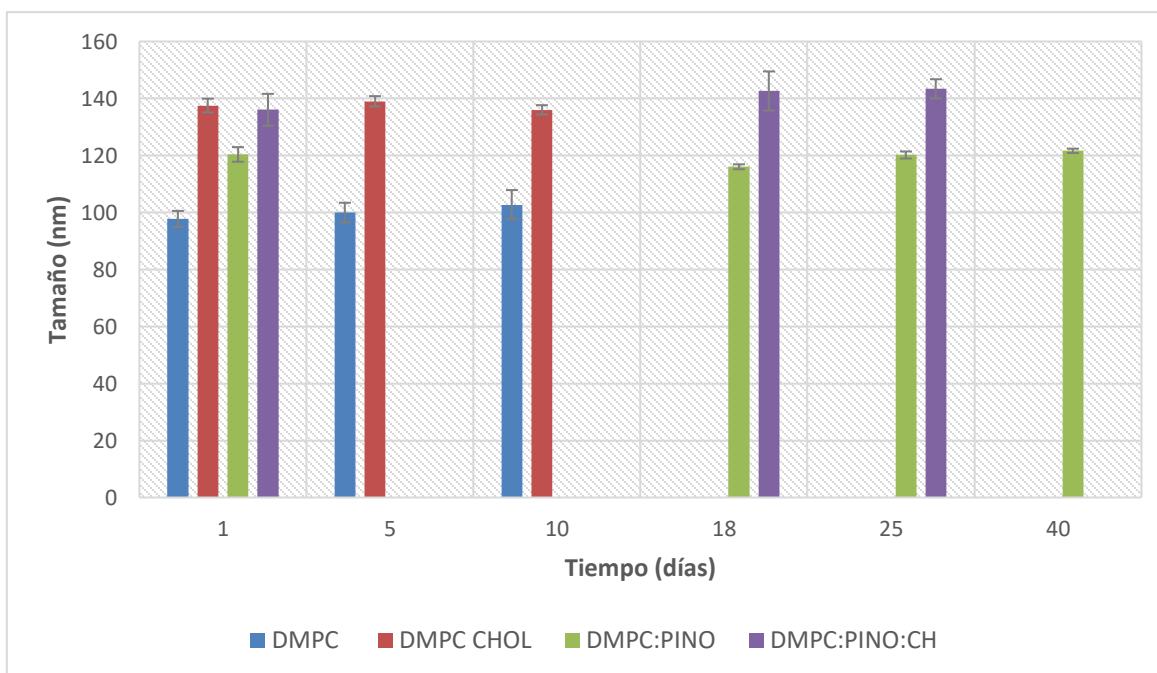


Figura 61. Estabilidad de los liposomas en medio amortiguado

La incorporación de colesterol no favorece la estabilidad en disolución de los sistemas en agua milli-Q ni en medio amortiguado. Otras proporciones de colesterol pueden ser estudiadas o podría descartarse utilizar este esteroide dependiendo del tipo de la vía de administración.

Los liposomas cargados con pinocebrina son más estables cuando se utiliza PSB para hidratarlos, el proceso de floculación tarda hasta 180 días en ocurrir. Utilizar este medio podría garantizar mayor vida de anaquel en una formulación.

10. CONCLUSIONES

Es posible obtener pinocebrina del extracto etánolico de propóleo.

La pinocebrina es prácticamente insoluble en agua, mientras que el extracto de propóleo tiene una solubilidad de $269 \pm 22 \mu\text{g/mL}$.

Esta investigación presenta el primer estudio fisicoquímico de la incorporación de pinocembrina con membranas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina. El flavonoide interacciona fuertemente con los fosfolípidos y se aloja en la zona cooperativa de la bicapa, entre el glicerol y los carbonos C1-C8 de los grupos acilo en las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa, modificando drásticamente el perfil de transición de fase.

Los liposomas que contienen pinocembrina presentan una transición de la fase gel a líquido cristalina reversible entre 10 y 75°C.

La incorporación de pinocembrina a diferentes concentraciones hace más fluida la membrana, disminuyendo las interacciones de van der Waals entre los fosfolípidos; en consecuencia, decrece la entalpía de fusión de las cadenas de acilo

La pinocembrina no se distribuye homogéneamente en la bicapa lipídica, se forman regiones con diferentes concentraciones de aditivo, a los cuales otros investigadores han nombrado dominios o separaciones de fase en la membrana.

La aparición de dos picos en la traza calorimétrica indica que la acumulación de pinocembrina conduce a la transición de liposomas esféricos a tubulares; ésta sería la primera vez que se reporta una transición de fase de este tipo utilizando calorimetría diferencial de barrido. La concentración a la cual inicia este proceso puede llamarse concentración crítica del aditivo (ACC) donde vesículas con diferentes propiedades fisicoquímicas coexisten. Este resultado es muy importante ya que las estructuras tubulares pueden penetrar la membrana celular con mayor facilidad.

Los liposomas hidratados en medio amortiguado son mucho más estables en disolución en comparación con los que se hidrataron en agua milli-Q. Su estabilidad en disolución fue de 60 días.

La adición de colesterol a los liposomas no aumentó la estabilidad en agua milli-Q ni en medio amortiguado.

Con los resultados reportados en este estudio es posible concluir que los liposomas formados con DMPC son una opción viable como sistemas acarreadores de pinocembrina para ser usada como sustancia activa en la industria farmacéutica.

Se recomiendan pruebas adicionales de actividad in vitro de pinocembrina incorporada en liposomas de DMPC.

REFERENCIAS

1. Chen Z, Rasul A, Zhao C, Millimouno FM, Tsuji I, Yamamura T, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. *Bangladesh J Pharmacol* [Internet]. 2013;8. Available from: <http://www.banglajol.info/index.php/BJP/article/view/14795>
2. Lan X, Han X, Li Q, Li Q, Gao Y, Cheng T, et al. Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia. *Brain Behav Immun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;61:326–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.012>
3. Liu R, Li JZ, Song JK, Zhou D, Huang C, Bai XY, et al. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiol Aging* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35:1275–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.031>
4. Lungkaphin A, Pongchaidecha A, Palee S, Arjinajarn P, Pompimon W, Chattipakorn N. Pinocembrin reduces cardiac arrhythmia and infarct size in rats subjected to acute myocardial ischemia/reperfusion. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr métabolisme* [Internet]. 2015;40:1031–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319563>
5. Uria-Canseco E, Perez-Casas S. Spherical and tubular dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *J Therm Anal Calorim*. Springer International Publishing; 2019;
6. Romero-Arrieta MR, Uria-Canseco E, Perez-Casas S. Simultaneous encapsulation of hydrophilic and lipophilic molecules in liposomes of DSPC. *Thermochim Acta*. 2020;687.
7. Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2:303–36.
8. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79:629–61.
9. Magaña Magaña MA, Tavera Cortés ME, Salazar Barrientos LL, Sanginés García JR. Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2017;7:1103.
10. do Nascimento TG, da Silva PF, Azevedo LF, da Rocha LG, de Moraes Porto ICC, Lima e Moura TFA, et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Res Lett* [Internet]. Nanoscale Research Letters; 2016;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s11671-016-1517-3>
11. Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* [Internet]. 2010;41:295–311. Available from: <http://link.springer.com/10.1051/apido/2010016>
12. Machado GMDC, Leon LL, De Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:73–7.
13. Probst IS, Sforcin JM, Rall VLM, Fernandes AAH, Fernandes JA. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *J Venom Anim Toxins Incl Trop*

Dis. 2011;17:159–67.

14. Alday E, Navarro-navarro M, Garibay-escobar A, Robles-zepeda R, Hernandez J, Velazquez C. Advances in Pharmacological Activities and Chemical Composition of Propolis Produced in Americas. *Beekeep Bee Conserv - Adv Res.* 2016;99–151.
15. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2002;80:67–73.
16. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.* 2016;30:894–905.
17. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36:347–63.
18. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160:189–95.
19. Xu Y, Luo L, Chen B, Fu Y. Recent development of chemical components in propolis. *Front Biol China.* 2009;4:385–91.
20. Santos AC, Uyemura SA, Lopes JLC, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:1455–61.
21. Zhang L, Guo Y, Zhou Z, Du G, Lu Y. Purity determination and uncertainty evaluation of a new certified reference material of Pinocembrin. *Anal Methods [Internet].* 2014;6:2699. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay42069h>
22. Ruddock PS, Charland M, Ramirez S, López A, Towers GHN, Arnason JT, et al. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis.* 2011;38:82–8.
23. Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X. Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
24. Soromou LW, Jiang L, Wei M, Chen N, Huo M, Chu X, et al. Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion. *J Immunotoxicol.* 2014;11:56–61.
25. Peng L, Yang S, Cheng YJ, Chen F, Pan S, Fan G. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Sci Biotechnol.* 2012;21:1533–9.
26. Lan X, Wang W, Li Q, Wang J. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Mol Neurobiol [Internet].* 2016;53:1794–801. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9125-2>
27. Di L, Kerns EH. Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization. *Drug-Like Prop. Concepts, Struct. Des. Methods from ADME to Toxic. Optim.*

2016.

28. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* 2014.

29. Shchipunov Y. Self-organising structures of lecithin. *Russ Chem Rev* [Internet]. 1997;66:301–22. Available from: <http://iopscience.iop.org/0036-021X/66/4/R02>

30. Chettri P, Roy B, Panda AK, Guha P, Nahak P, Karmakar G, et al. Influence of Lipid Composition, pH, and Temperature on Physicochemical Properties of Liposomes with Curcumin as Model Drug. *J Oleo Sci.* 2016;65:399–411.

31. Malcolmson RJ, Higinbotham J, Beswick PH, Privat PO, Saunier L. DSC of DMPC liposomes containing low concentrations of cholesteryl esters or cholesterol. *J Memb Sci.* 1997;123:243–53.

32. Belosludtsev KN, Penkov N V., Tenkov KS, Talanov EY, Belosludtseva N V., Agafonov A V., et al. Interaction of the anti-tuberculous drug bedaquiline with artificial membranes and rat erythrocytes. *Chem Biol Interact* [Internet]. Elsevier; 2019;299:8–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.017>

33. Gharib R, Auezova L, Charcosset C, Greige-Gerges H. Effect of a series of essential oil molecules on DPPC membrane fluidity: a biophysical study. *J Iran Chem Soc.* Springer Berlin Heidelberg; 2018;15:75–84.

34. Malekar SA, Sarode AL, Bach AC, Worthen DR. The Localization of Phenolic Compounds in Liposomal Bilayers and Their Effects on Surface Characteristics and Colloidal Stability. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2016;17:1468–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-016-0483-5>

35. Li H, Chen F. Preparation and quality evaluation of coenzyme Q10 long-circulating liposomes. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. King Saud University; 2017;24:797–802. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.025>

36. Fan Y, Zhang Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;8:81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.010>

37. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics.* 2017;9:1–33.

38. Subczynski WK, Wisniewska A, Subczynski WK, Wisniewska A, Yin JJ, Hyde JS, et al. Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol. *Biochemistry.* 1994;33:7670–81.

39. Kuete V, Mbaveng AT, Zeino M, Fozing CD, Ngameni B, Kapche GDWF, et al. Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine.* Elsevier Ltd.; 2015;22:1096–102.

40. Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res.* 2015;5:231–42.

41. Aygun A, Torrey K, Kumar A, Stephenson LD. Investigation of factors affecting controlled release from photosensitive DMPC and DSPC liposomes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;
42. Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids*. 2014.
43. Shashi K, Satinder K, Bharat P. a Complete Review on : Liposomes Upon Composition and. *Int Res J Pharm*. 2012;3:10–6.
44. Wei X, Patil Y, Ohana P, Amitay Y, Shmeeda H, Gabizon A, et al. Characterization of Pegylated Liposomal Mitomycin C Lipid-Based Prodrug (Prometil) by High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry and Cryogenic Transmission Electron Microscopy. *Mol Pharm*. 2017;14:4339–45.
45. Wu RG, Wang YR, Wu FG, Zhou HW, Zhang XH, Hou JL. A DSC study of paeonol-encapsulated liposomes, comparison the effect of cholesterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior of liposomes. *J Therm Anal Calorim*. 2012;109:311–6.
46. Granados-Pineda J, Uribe-Uribe N, García-López P, Ramos-Godinez M del P, Rivero-Cruz JF, Pérez-Rojas JM. Effect of pinocembrin isolated from Mexican brown propolis on diabetic nephropathy. *Molecules*. 2018;23:1–19.
47. Azimova SS. Glycyrrhiza [Internet]. *Nat. Compd. Flavonoids*. 2013. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0535-1>
48. Shain L. Pinocembrin: An Antifungal Compound Secreted by Leaf Glands of Eastern Cottonwood. *Phytopathology*. 1982;
49. Yang X, Wang X, Chen XY, Ji HY, Zhang Y, Liu AJ. Pinocembrin–lecithin complex: Characterization, solubilization, and antioxidant activities. *Biomolecules*. 2018;8.
50. Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface* [Internet]. 2014;11:20140459–20140459. Available from: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2014.0459>
51. Manzoni V, Coutinho K, Canuto S. An insightful approach for understanding solvatochromic reversal. *Chem Phys Lett* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;655–656:30–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2016.05.028>
52. Tanjung M, Tjahjandarie TS, Sentosa MH. Antioxidant and cytotoxic agent from the rhizomes of *Kaempferia pandurata*. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2013;
53. Emami S, Azadmard-Damirchi S, Peighambaroust SH, Valizadeh H, Hesari J. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J Exp Nanosci* [Internet]. Taylor & Francis; 2016;11:737–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17458080.2016.1148273>
54. Gonnet M, Lethuaut L, Boury F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;146:276–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037>
55. Di Foggia M, Bonora S, Tinti A, Tugnoli V. DSC and Raman study of DMPC liposomes in presence of Ibuprofen at different pH. *J Therm Anal Calorim*. Springer Netherlands; 2017;127:1407–17.
56. Taylor KMG, Morris RM. Thermal analysis of phase transition in liposomes behaviour.

Thermochim Acta. 1995;248:289–301.

57. Ohline SM, Campbell ML, Turnbull MT, Kohler SJ. Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. A Biophysical Chemistry Experiment. *J Chem Educ* [Internet]. 2001;78:1251. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed078p1251>

58. Lentz BR, Barenholz Y, Thompson E. Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. I. Single component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry*. 1976;15:4521–8.

59. Basso LGM, Rodrigues RZ, Naal RMZG, Costa-Filho AJ. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;1808:55–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.08.009>

60. El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Drug interaction and location in liposomes: Correlation with polar surface areas. *Int J Pharm*. 2005;292:179–85.

61. Barenholz Y, Bombelli C, Bonicelli MG, Profio P di, Giansanti L, Mancini G, et al. Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;356:46–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.11.062>

62. Pruchnik H. Influence of cytotoxic butyltin complexes with 2-sulfobenzoic acid on the thermotropic phase behavior of lipid model membranes. *J Therm Anal Calorim*. Springer Netherlands; 2017;127:507–14.

63. Mady MM, Shafaa MW, Abbase ER, Fahium AH. Interaction of Doxorubicin and Dipalmitoylphosphatidylcholine Liposomes. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62:481–6.

64. Momo F, Fabris S, Stevanato R. Interaction of fluoxetine with phosphatidylcholine liposomes. *Biophys Chem*. 2005;118:15–21.

65. Zhao L, Feng SS, Kocherginsky N, Kostetski I. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *Int J Pharm*. 2007;338:258–66.

66. Jain MK, Wu NM. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. *J Membr Biol*. 1977;34:157–201.

67. Neunert G, Tomaszewska-Gras J, Siejak P, Pietralik Z, Kozak M, Polewski K. Disruptive effect of tocopherol oxalate on DPPC liposome structure: DSC, SAXS, and fluorescence anisotropy studies. *Chem Phys Lipids*. 2018;216:104–13.

68. Arrowsmith M, Hadgraft J, Kellaway IW. The interaction of cortisone esters with liposomes as studied by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm*. 1983;16:305–18.

69. FILDES FJT, OLIVER JE. Interaction of cortisol-21-palmitate with liposomes examined by differential scanning calorimetry. *J Pharm Pharmacol*. 1978;30:337–42.

70. Zhang W, Wang Z, Wu C, Jin Y, Liu X, Wu Z, et al. The effect of DSPE-PEG2000, cholesterol and drug incorporated in bilayer on the formation of discoidal micelles. *Eur J Pharm Sci* [Internet].

Elsevier; 2018;125:74–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.013>

71. Edwards K, Johnsson M, Karlsson G, Silvander M. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophys J* [Internet]. Elsevier; 1997;73:258–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78066-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78066-4)

72. Park SJ, Seo MK. Intermolecular Force. *Interface Sci. Technol.* 2011.

73. Mui BL, Döbereiner HG, Madden TD, Cullis PR. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys J.* 1995;69:930–41.

74. Size P, Size M. *Zetasizer aps user manual.* 2008;

75. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006;103:4930–4. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600997103>

76. Sakuragi M, Taguchi K, Kusakabe K. Structural and biological characterization of Fe₃O₄-loaded spherical and tubular liposomes for use in drug delivery systems. *Jpn J Appl Phys.* 2017;56.

77. Svetina S, Bötjanež. Shape behavior of lipid vesicles as the basis of some cellular processes. *Anat Rec.* 2002;268:215–25.

78. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1:147–68.

PUBLICACIONES

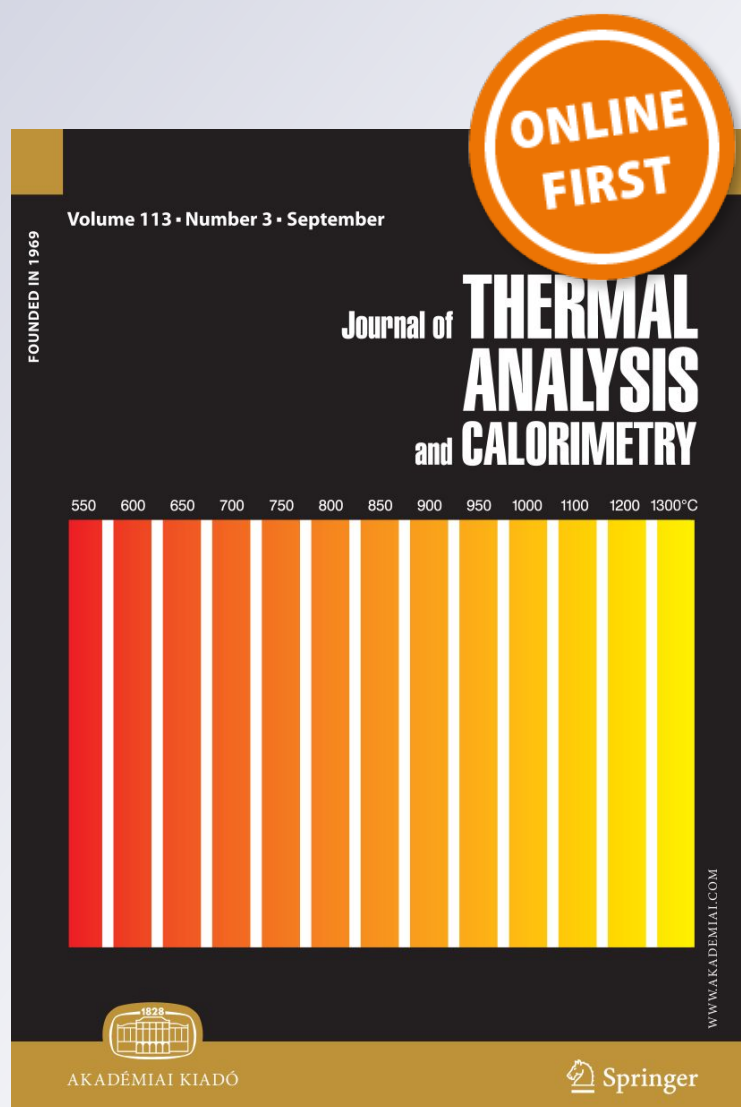
Spherical and tubular dimyristoylphosphatidylcholine liposomes

Elizabeth Uria-Canseco & Silvia Perez-Casas

**Journal of Thermal Analysis and
Calorimetry**
An International Forum for Thermal
Studies

ISSN 1388-6150

J Therm Anal Calorim
DOI 10.1007/s10973-019-08416-0



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Spherical and tubular dimyristoylphosphatidylcholine liposomes

Phase transition induced by pinocembrin

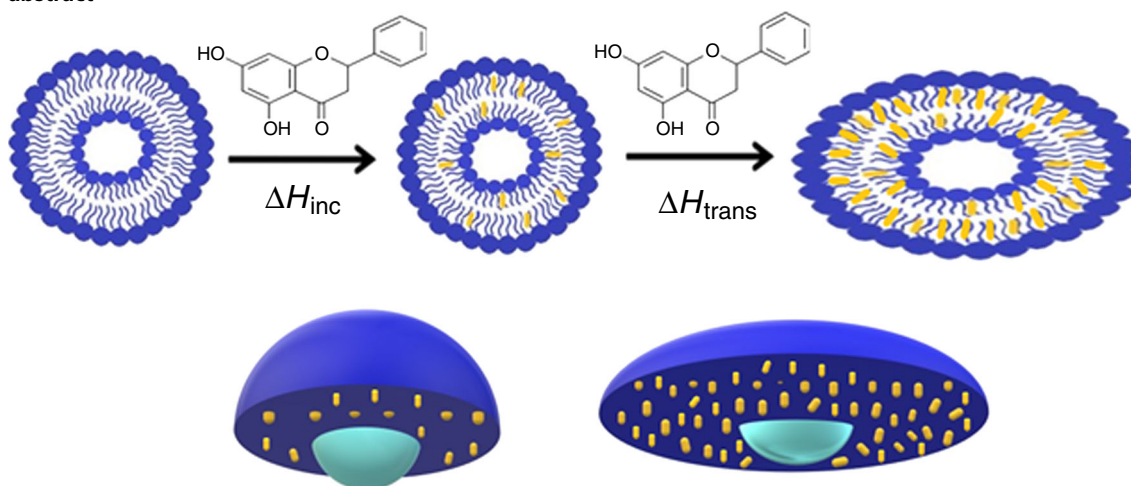
Elizabeth Uria-Canseco¹ · Silvia Perez-Casas¹

Received: 30 November 2018 / Accepted: 25 May 2019
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Abstract

A physicochemical study of the interaction of pinocembrin with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) liposomes was carried out. Unilamellar vesicles of about 100 nm were prepared. Pinocembrin was incorporated into the lipid membrane by interacting strongly with the acyl groups of the phospholipid chains, favoring the fluid phase. The incorporation efficiency was 89%. At concentrations higher than 0.436 mg mL^{-1} of pinocembrin, a change of structure from spherical to tubular liposomes was observed, and the enthalpy of this transition was determined by differential scanning calorimetry. After 0.744 mg mL^{-1} , there was no change in the transition enthalpy from gel phase to liquid crystalline, so it is possible to assume that the lipid membrane reached saturation. With the findings presented in this research, it is possible to increase the solubility and bioavailability of the pinocembrin by using DMPC as a molecular carrier, enhancing its use as drug in the pharmaceutical industry to treat cancer, ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, Alzheimer's disease, cardiovascular diseases and atherosclerosis as well as other diseases.

Graphic abstract



Keywords DMPC · Tubular liposome · Pinocembrin · Cancer · DSC · Drug delivery system

✉ Silvia Perez-Casas
silpeca@unam.mx

¹ Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Introduction

Cancer provokes near to 8 million of deaths for year, which makes it the main cause of death in the world [1]. Most of these deaths occur among people from poor countries [2]. In 2015, the World Health Organization reported that

malignant tumors of lung, prostate, colorectal, stomach and liver are the most common among males, while in females are breast, colorectal, lung, uterus and stomach.

The high level of cancer around the world and the research of new therapies to treat efficiently the different kinds of this illness had led to explore molecules contained in natural products that can be used as an active substance and could exhibit less adverse effects instead of actual therapies.

Pinocembrin is the main flavonoid found in propolis and honey, and these substances are produced by bees of *Apis mellifera* species; it can also be found in plants, fruits, vegetables, nuts, seeds and other natural sources [3]. This molecule has shown to have biological activity such as antibiotic, fungicide, antioxidant, antitumor, anticancer, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Also, pinocembrin has displayed a variety of properties that could hold promise for treating diseases such as atherosclerosis, ischemic shock, cancer, cardiovascular diseases and diseases in the central nervous system [4–12]. However, its low solubility limits its application and bioavailability.

Liposomes are spherical vesicles composed by lipid bilayer with an aqueous core, in which it is possible to host hydrophobic, hydrophilic and amphiphilic molecules. This characteristic confers them great versatility like drug delivery systems.

Currently, interactions of pinocembrin with liposomes have not been investigated. The objective of this work was to perform a physicochemical study of unilamellar liposomes of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), to increase the solubility and bioavailability of pinocembrin as well as to potentiate its use as an active substance. DMPC liposomes have been shown to be effective as a carrier of many therapeutic agents to cells and tissues [13–15]. In addition, DMPC is the commercial synthetic phospholipid with the shortest chain which makes the manufacture of liposomes relatively simple.

Milli-Q water was used to hydrate liposomes. The effects of the addition of pinocembrin upon the main transition of fully hydrated DMPC vesicles have been measured with differential scanning calorimetry (DSC). The thermotropic phase behavior and the organization and dynamics of liposomal aqueous dispersions in gel and liquid crystalline phases have been extensively studied with DSC [16–18].

The characteristics of blank and loaded liposomes with pinocembrin were determined using dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

Experimental

Materials

The pinocembrin, DMPC, dichloromethane and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals were of the highest available quality and were used without additional purification; their properties are described in Table 1. The structures of pinocembrin and DMPC are depicted in Fig. 1.

Methodology

Liposome preparation

Liposomes were prepared by using the thin-film hydration technique, with some modifications. Briefly, DMPC was dissolved in CH_2Cl_2 in a round-bottom flask. The organic solvent was removed via rotary evaporation to obtain a thin film on the wall of the flask. During the process, the conditions such as speed (60 rpm) and temperature (20 °C above the main lipid transition) were controlled. To remove the solvent residual completely, the temperature was increased to 55 °C during 15 min under vacuum. The film was kept overnight. Then, the lipid film was hydrated with mechanical stir using distilled and deionized water (Barnstead Nanopure Infinity, with a resistivity of 18 $\text{M}\Omega\text{-cm}$) at 45 °C. The resultant suspension was sonicated for about 30 min; a milky white suspension was formed. Finally, the liposomal solution was extruded through polycarbonate membrane of 100-nm pore size (LIPEXTM EXTRUDER, Canada) to obtain unilamellar liposomes with a uniform size distribution. The final concentration of liposomal suspension was 10 mM.

Pinocembrin was added together with the solvent, and the concentration ranged between 0.133 and 0.940 mg mL^{-1} .

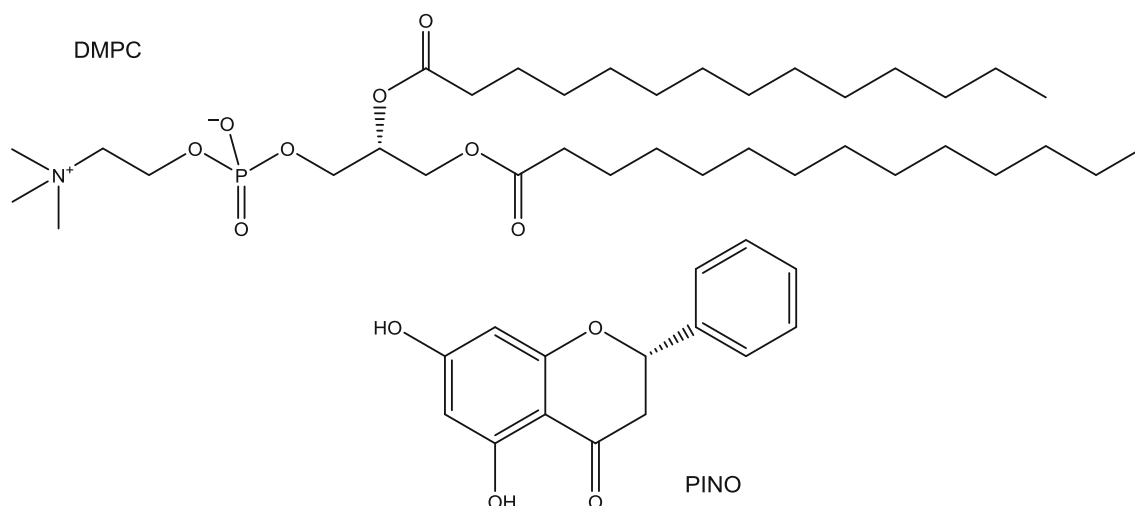
Liposome characterization

The size distribution (mean diameter and polydispersity index) of liposomes was measured by dynamic light scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK). Samples were stored at 25 °C.

Surface and morphology of liposomes were observed with a field-emission scanning electron microscope, JEOL JSM-5900-LV (Jeol, USA) and JEOL JEM-2010 transmission electron microscope (Jeol, USA). SEM and TEM images were analyzed to determine the structure of the particles.

Table 1 Properties of chemicals used

Chemical	Notation	Source	Purity ^a /%	Batch
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DMPC	Sigma	99	88F-8377
Pinocembrin	PINO	Sigma-Aldrich	95	MKBZ2780 V
Dichloromethane	–	J.T. Baker	99.98	T34C64
Ethanol	–	J.T. Baker	99.9	L46C59-5

^aAs stated by supplier**Fig. 1** Chemical structures of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and pinocembrin (PINO)

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC measurements were taken using a MicroCal VP-DSC system (Malvern, USA). Degassed sample and reference (Milli-Q water) were loaded into the corresponding cell and were scanned in a cycle of heating–cooling–reheating from 10 to 70 °C at a rate of 90 °C h⁻¹, using a filtering period of 10 s; the cycle was repeated three times resulting in three identical scans. A baseline, run before each determination with solvent loaded in sample and reference cells, was subtracted from individual results on data analysis.

Thermodynamic parameters were obtained using the original software provided by MicroCal (Microcal Analysis Launcher). The transition midpoint, T_m , is the temperature at which the main transition occurs, and it corresponds to the maximum value of heat capacity; the transition enthalpy, ΔH , normalized per mol of phospholipid, is calculated from the area under the transition peak; and the temperature width at half peak height, $\Delta T_{1/2}$, is the sharpness of the phase transition.

Deconvolution of calorimetric curves with two peaks was obtained with Origin Lab. 9.0 software.

Incorporation efficiency

The quantity of pinocembrin encapsulated was determined by spectroscopy UV–Vis (Varian CARY 50, Australia). A standard curve in ethanol was constructed by plotting pinocembrin concentration, 2.4–14.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, versus absorbance. Equation 1 corresponds to the linear regression equation ($r = 0.9959$), where A is the absorbance at 290 nm and Cx is the pinocembrin concentration in the sample.

$$A = 0.0685Cx + 0.0112 \quad (1)$$

Liposome encapsulation efficiency was measured by determining the amount of entrapped drug. Briefly, a small volume (500 μL) of the drug-loaded liposomal suspension was placed into the Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (10 kDa), and then, it was centrifuged at 15,000 rpm for 25 min at 25 °C in order to separate the unloaded drug. Later withdrawing the filter compartment, the concentration of pinocembrin in the filtrate was measured after dilution in ethanol (unentrapped drug).

The total amount of the drug was assessed into the liposomal suspension, and the Amicon[®] Ultra filter device was placed upside down in a clean microcentrifuge tube; then, it was centrifuged at 15,000 rpm for 2 min at 25 °C (incorporated drug), and the absorbance at 290 nm of an

aliquoted diluted in ethanol was measured. Using Eq. 1, the quantity of pinocembrin incorporated in liposomes was determined.

The drug encapsulation efficiency EE was calculated using Eq. 2:

$$EE(\%) = \frac{[Cid]}{[Ct]} \times 100 \quad (2)$$

where Ct is the total drug and Cid is the incorporated drug in the sample.

Results and discussion

Thermotropic behavior of liposomes with different concentrations of pinocembrin

Liposomes formed by a single type of phospholipid have a characteristic phase transition temperature, associated with the melting of the lipid chains of the phospholipids that form them. This structural change is generally known as the transition temperature from the gel phase to the liquid crystalline phase, and it happens at a defined temperature, known as T_m . This temperature can be monitored by DSC, in addition to the energy associated with such transition. When it comes to the pure phospholipid, the calorimetric trace corresponds to a sharp and narrow peak, because the fusion of the lipid chains occurs in a tight temperature range. The interaction of the acyl groups with other substances can be tested by the modifications undergone by the phase transition profile [19].

Figure 2 shows the calorimetric trace of DMPC according to the concentration of pinocembrin. These systems were prepared in water to study, only, the effect of

the flavonoid without the interference of some other additive.

In the liposomes of the pure phospholipid, the experimental T_m value was 23.3 °C and the transition enthalpy was 4.54 kcal mol⁻¹, and these results agree with the values reported in the literature [20–23].

Hydrophobic molecules, such as pinocembrin, are incorporated into the bilayer, modifying the thermotropic behavior of liposomes. This effect depends on the concentration and structure of the host molecule, so that in a certain temperature range, a certain amount of additive modifies the phase transition [24], shifting the T_m and it can even cause the irreversible fluidization of the membrane at higher concentrations.

Figure 2 shows the thermotropic behavior of the DMPC liposomes with different concentrations of pinocembrin. As can be seen, the T_m is ranged to lower values of temperature as the amount of pinocembrin increases, and in other words, the liquid crystalline phase is favored and the membrane becomes more fluid, which suggests a strong interaction between the pinocembrin and the acyl groups of the liposome.

The cooperative units measure the amount of phospholipids that undergo a simultaneous transition. This means that the lipids do not melt independently from one another, but they do so as a single cooperative domain. $\Delta T_{1/2}$ has been associated with the cooperativity of the phase transition [25], and this parameter is very sensitive to the presence of any additive in the bilayer [26], being increasing as the concentration of additive increases, which means that the size of the cooperative unit decreases.

The increase in $\Delta T_{1/2}$ in the liposomes studied confirms the intercalation of pinocembrin in the chains of the acyl groups of DMPC, decreasing the cooperativity. With these results, it can be inferred that pinocembrin is in the cooperative zone of the bilayer, namely, in the region of the C1–C8 carbon atoms of the acyl chain [21].

In Fig. 2, it is clear that the sharp and symmetric peak, characteristic of the pure liposome, widens and deforms, until a point in which the appearance of a shoulder or a second peak (0.436 mg mL⁻¹) is observed, and this result suggests a formation of domains with different compositions or a separation of phases, as it has been observed in other studies of liposomes doped with hydrophobic molecules [27–30].

Table 2 shows the thermodynamic parameters of the DMPC liposomes in water with different concentrations of pinocembrin. At concentrations of 0.436 and 0.480 mg mL⁻¹, a second peak appears in the calorimetric trace, so it was necessary to make a deconvolution of the signal in order to identify the individual contribution of the peaks to the thermodynamic parameters. The results of this

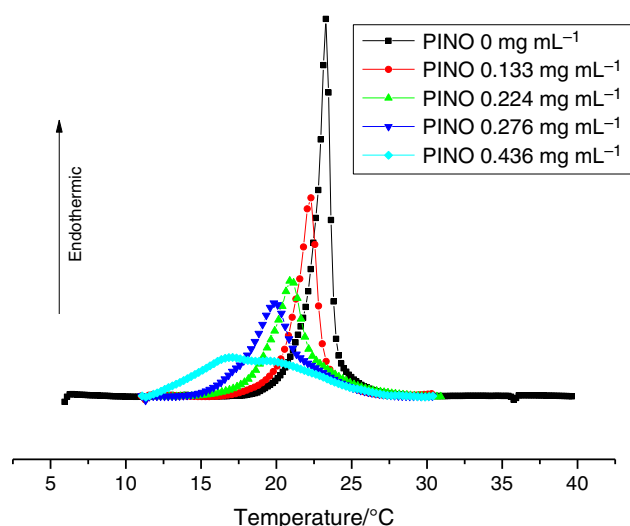


Fig. 2 DSC thermal response of DMPC liposomes according to the pinocembrin (PINO) concentration

Table 2 Thermodynamic parameters: (T_m) main phase transition temperature, ($\Delta T_{1/2}$) peak half width and (ΔH) enthalpy change of the main phase transition, size and polydispersity index (PDI) for DMPC liposomes, in the presence of selected concentrations of pinocembrin

PINO/mg mL ⁻¹	ΔH /kJ mol ⁻¹	T_m /°C	$\Delta T_{1/2}$ /°C	Size/nm	PDI			
0	19.00 ± 1.21	23.3 ± 0.0	0.9 ± 0.1	130 ± 7	0.125 ± 0.022			
0.133	13.59 ± 0.55	22.3 ± 0.0	1.3 ± 0.1	138 ± 4	0.167 ± 0.005			
0.224	12.38 ± 0.10	21.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	109 ± 2	0.079 ± 0.019			
0.276	12.24 ± 0.06	19.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	140 ± 12	0.115 ± 0.037			
0.33	12.53 ± 0.40	19.1 ± 0.1	4.6 ± 0.1	133 ± 6	0.200 ± 0.002			
0.414	12.34 ± 0.41	18.9 ± 0.2	7.4 ± 0.3	146 ± 12	0.109 ± 0.023			
0.436*	2.59 ± 0.18 ^a	9.19 ± 0.11 ^b	15.9 ± 0.0 ^a	19.8 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.2 ^a	6.7 ± 0.1 ^b	147 ± 4	0.096 ± 0.010
0.480*	1.77 ± 0.05 ^a	9.06 ± 0.12 ^b	15.5 ± 0.1 ^a	20.1 ± 0.1 ^b	4.2 ± 0.1 ^a	7.9 ± 0.1 ^b	146 ± 3	0.103 ± 0.014
0.504	7.19 ± 0.84	19.1 ± 0.1	8.8 ± 0.4	126 ± 5	0.165 ± 0.003			
0.572	6.64 ± 0.30	18.8 ± 0.1	8.9 ± 0.1	131 ± 8	0.130 ± 0.021			
0.63	5.39 ± 0.15	18.6 ± 0.2	8.7 ± 0.1	116 ± 5	0.132 ± 0.016			
0.744	4.49 ± 0.24	18.3 ± 0.4	8.4 ± 0.1	140 ± 13	0.236 ± 0.023			
0.820	3.25 ± 0.32	17.8 ± 0.2	7.9 ± 0.3	144 ± 3	0.083 ± 0.016			
0.860	3.42 ± 0.23	17.5 ± 0.1	7.9 ± 0.1	135 ± 7	0.156 ± 0.012			
0.940	4.44 ± 0.26	18.5 ± 0.2	8.2 ± 0.1	107 ± 5	0.113 ± 0.024			

*Deconvoluted peaks. ^aPeak 1 and ^bpeak 2

deconvolution are shown in the table identified with an asterisk.

Figure 3 shows the multipeak analysis carried out on the systems with 0.436 and 0.480 mg of pinocembrin. With a greater amount of the additive, it is possible to appreciate that the size of peak 1 decreases, its enthalpy is smaller, while peak 2 remains practically unchanged; T_m has the same tendency.

On the other hand, we can deduce that peak 2 is the one that contains the highest amount of the additive since the $\Delta T_{1/2}$ is greater. If the concentration is increased, both peaks widen; however, the change is more drastic in peak 2, which means that the added molecules are not distributed homogeneously, but they have a preference to accumulate where there is a greater amount of pinocembrin.

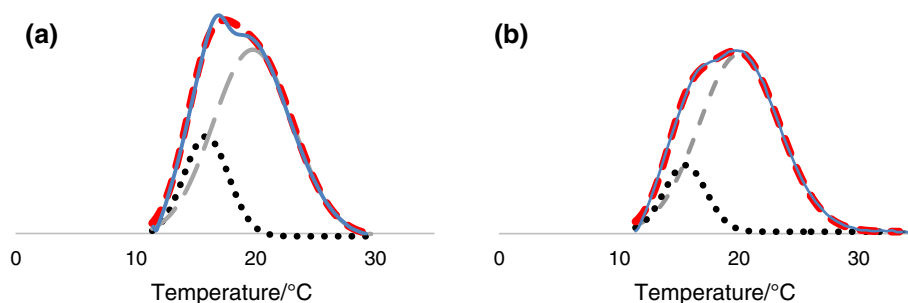
The intercalation of hydrophobic molecules in the bilayer causes a decrease in the packing between the lipid chains and modifies local hydrophobicity in the region

where they are located [14]. When pure DMPC is found in the ordered condensed state, the hydrocarbon chains are fully extended and the phospholipid–phospholipid interactions are maximized. Pinocembrin interferes with bilayer organization because it blocks the order of phospholipids, which results in packing defects within the bilayer. In addition, the low polarity of pinocembrin could change the hydrophobicity of the membrane, as suggested by the studies of Subczynski et al. with lecithins and cholesterol [31], leaving a more favorable environment for the incorporation of more molecules, which can lead to the formation of domains with different compositions.

The slight increase in the size of the loaded vesicles is due to the incorporation of pinocembrin between the lipid chains (Table 2).

If pinocembrin continues to be added (Fig. 4), the shoulder disappears and the ΔH falls, tending to a constant value. This may imply that the membrane has reached the saturation and no more additive could be added.

Fig. 3 Deconvoluted DSC traces of DMPC with 0.436 (a) and 0.480 (b) mg mL⁻¹ of pinocembrin. Original DSC curve (solid lines), peak one (dotted lines), peak two (dashed lines), sum of deconvolution (short-dashed lines)



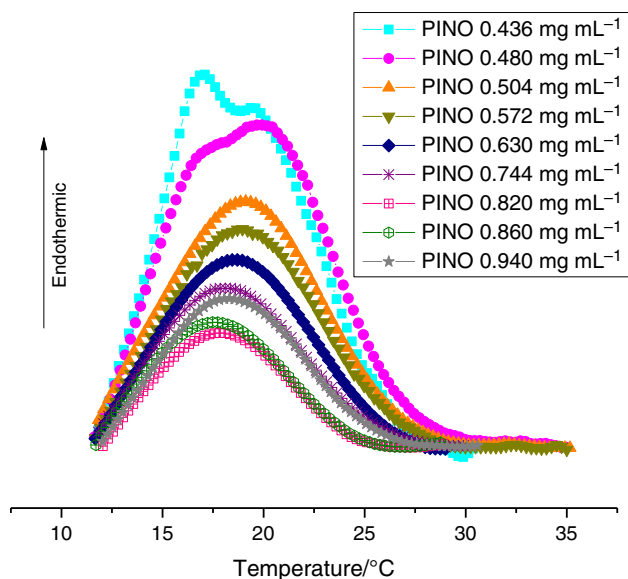


Fig. 4 DSC thermal response of DMPC liposomes according to different concentrations of pinocembrin

An explanation for the phenomenon observed is the one that is proposed below and is mapped in Fig. 5:

1. Figure 5a represents the pure liposome. At low concentrations of pinocembrin, this is evenly distributed in the bilayer (Fig. 5b).
2. By continuing to add the additive, some regions begin to accumulate a greater amount of pinocembrin; around 0.276 mg mL^{-1} initiates the phase enrichment; in other words, poor and rich domains in pinocembrin are formed, so the calorimetric trace is deformed.
3. With a greater amount of pinocembrin, two peaks in the DSC curve appear (Fig. 4). It is possible that the excess additive in the bilayer will lead to a change in structure; therefore, the coexistence of spherical liposomes (with a lower concentration of pinocembrin) and tubular-type liposomes (rich in pinocembrin) have transition temperatures of different phases.
4. At higher concentration of pinocembrin, above 0.744 mg mL^{-1} , practically all liposomes are

homogeneously doped, only tubular structures existing (Fig. 5c). This transformation is clearly shown in the micrographs obtained by SEM (Fig. 8).

Arrowsmith and Oliver used $\Delta T_{1/2}$ as a criterion to determine the maximum incorporation of additive in DPPC liposomes [32, 33]. Taylor mentions that this is one of the few methods available to determine the amount of hydrophobic material incorporated in liposomes [21]. These authors agree that once the phase separation begins, the membrane has been saturated. This definition can lead to the idea that it is not possible to add more host molecules in the liposomes. However, in this study it is shown that if pinocembrin continues to be added, it will continue to be incorporated in the domains with lower concentrations of the additive, which leads to a change in the structure of the liposomes. Therefore, we can define the beginning of the phase separation as the additive critical concentration (ACC) and it corresponds to the transition from spherical to tubular structures, as it will be shown in the following paragraphs.

In Fig. 6, $\Delta T_{1/2}$ is plotted according to the concentration of pinocembrin. It can be seen that the width of the peak increases as the amount of pinocembrin increases; when two peaks appear in the calorimetric trace, $\Delta T_{1/2}$ reaches a maximum value: the ACC point; and, subsequently, it remains practically constant with a slight increase in cooperativity.

The phase behavior of the lipid membrane has very important implications in the properties of liposomes, such as stability, fluidity and permeability [34]; knowing the ACC is an essential step in the design of liposomal release systems, especially if it is necessary to incorporate another drug in the formulation, since the morphology of the liposome is related to the load capacity of hydrophobic molecules, the emptying of hydrophilic molecules as well as the circulation time in the bloodstream [35].

Figure 7 displays the change in enthalpy according to the concentration of pinocembrin obtained by DSC. In this image, we can notice that the ΔH drastically falls with 0.133 mg mL^{-1} ; subsequently, with 0.224 mg mL^{-1} , there

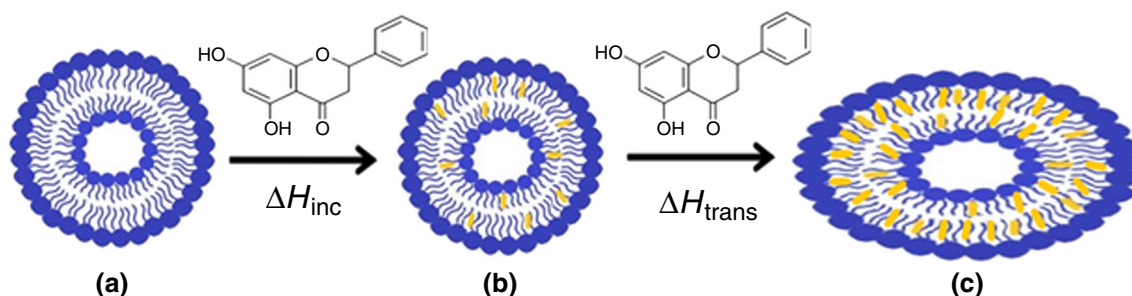


Fig. 5 Mapping of the pinocembrin distribution in the lipid bilayer. Pure liposome (a), spherical liposome (b), tubular liposome (c). Enthalpy of incorporation of pinocembrin (ΔH_{inc}). Enthalpy of transition from spherical liposomes to tubular liposomes (ΔH_{tra})

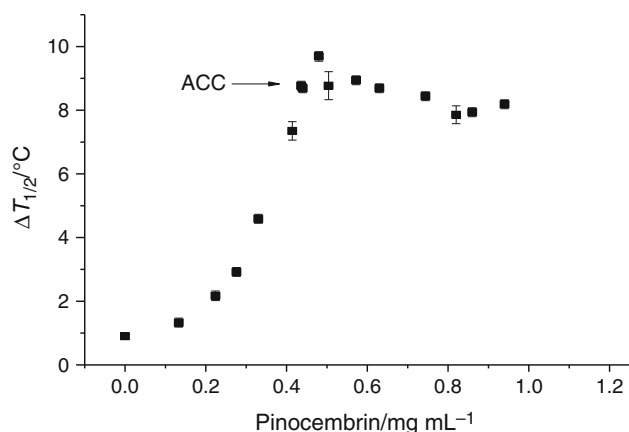


Fig. 6 $\Delta T_{1/2}$ versus pinocembrin concentration. Determination of the additive critical concentration (ACC)

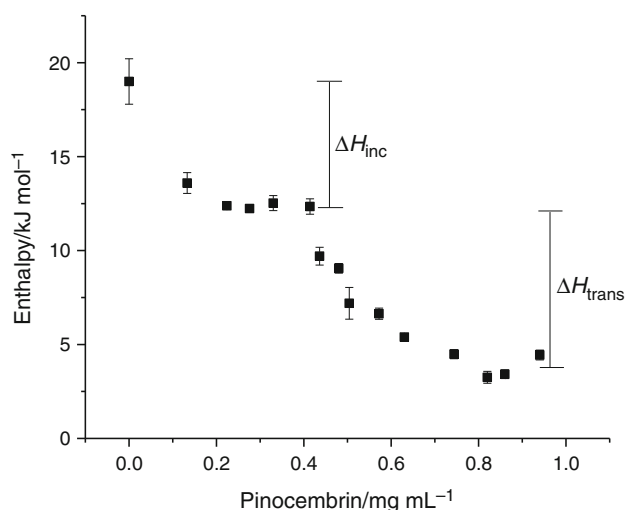


Fig. 7 ΔH of main transition obtained by DSC versus pinocembrin concentration. Enthalpy of pinocembrin incorporation (ΔH_{inc}), enthalpy the transition from spherical liposomes to tubular liposomes (ΔH_{trans})

is a slight decrease in enthalpy; however, between 0.276 and 0.414 mg mL⁻¹ there is no significant change in the ΔH , which implies that although there is a greater amount of additive in the bilayer, the interactions between the molecules are equally favorable. Possibly structures with a greater degree of packaging are formed. These observations could confirm the presence of domains rich in pinocembrin highly ordered, as observed by Wei et al. in studies with DSPC [28]. In addition, we can suppose the formation of hydrogen bonds between the glycerol and the OH groups of the pinocembrin, and even pinocembrin–pinocembrin interactions that favor this type of arrangement.

When the phase separation begins, 0.436 mg mL⁻¹, enthalpy decreases again indicating that the large amount of pinocembrin intercalated in the bilayer interferes with

the van der Waals interactions between the phospholipid chains [36]. This means that the phospholipid molecules would interact with more than one pinocembrin molecule instead of the hydrocarbon chains of adjacent phospholipids, which reduces the long-range order in the bilayer and causes notable changes in the fluidity of the bilayer.

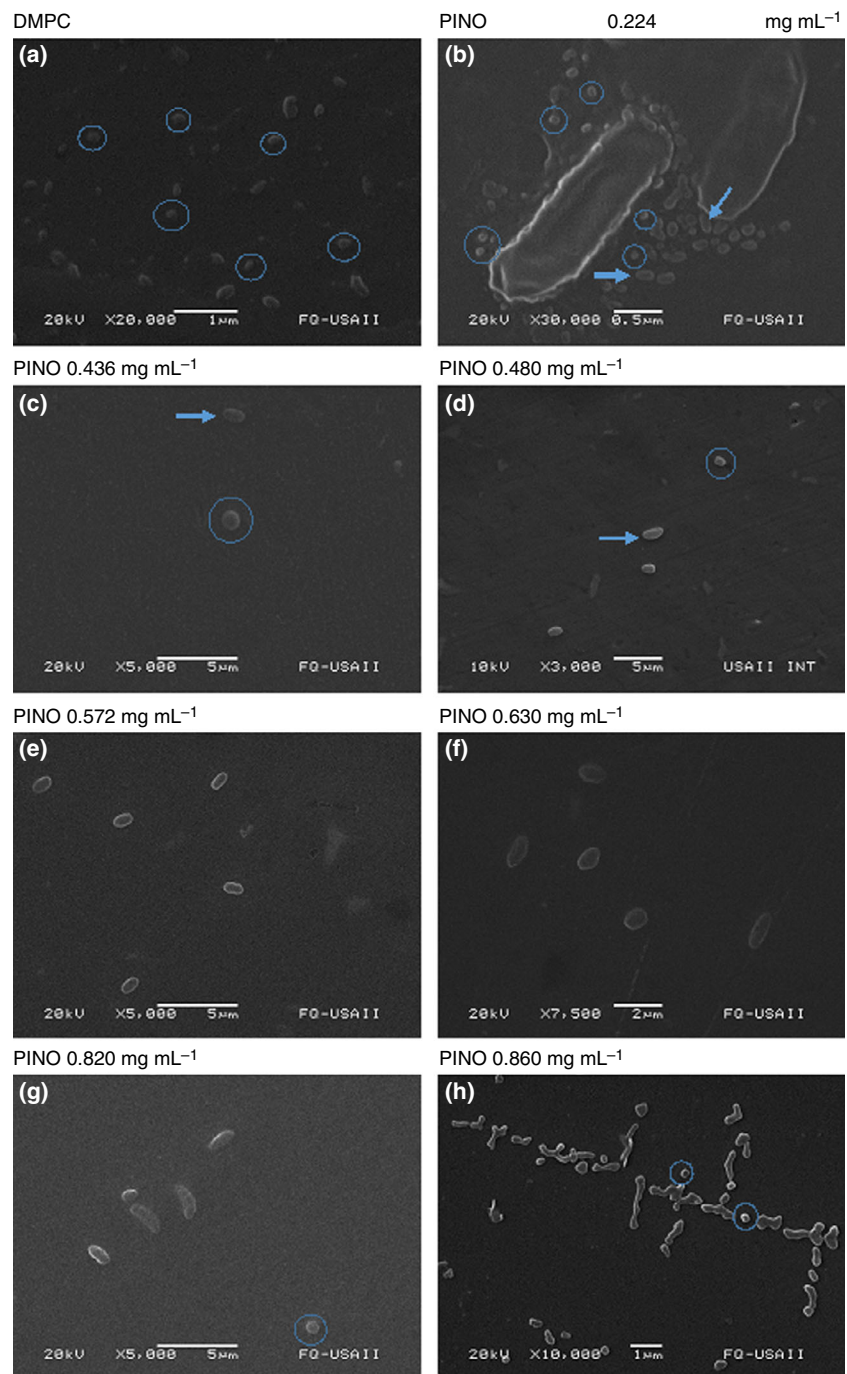
Above 0.744 mg mL⁻¹, the ΔH remains practically constant. We can assume that the species with the lowest amount of pinocembrin begin to get enriched and those with more pinocembrin reach a maximum value, which means that it is no longer possible to incorporate more additive and maintain the spherical shape; thus, the transition phase is promoted. These results suggest that tubular structures have a higher load capacity compared to spherical liposomes.

Figure 7 shows two significant changes in the values of ΔH . The difference between ΔH of pure DMPC and ΔH of DMPC loaded with pinocembrin, represented by the average of enthalpies of the 0.2–0.4 mg mL⁻¹ points, can be attributed to the effect that causes the incorporation of pinocembrin into the morphology of the liposome (ΔH_{inc}). After the ACC, a smooth change of ΔH is observed again due to the transition from spherical liposomes to tubular liposomes, and this phenomenon has already been observed by K. Edwards et al. in PEGylated liposomes of phosphatidylcholine (polyethyleneglycol–phospholipids) loaded with cholesterol [37]. In this study, the structure change occurs in the concentration range of 0.436–0.744 mg mL⁻¹, where both morphologies coexist, as it is shown in the SEM micrographs (Fig. 8). Above 0.744 mg mL⁻¹, most tubular structures are observed. The difference between the average enthalpies of tubular liposomes with pinocembrin and the average enthalpies of spherical DMPC loaded with pinocembrin represents the transitional ΔH (ΔH_{trans}).

Taking into account the criteria described above, the ΔH_{inc} is -6.63 kJ mol⁻¹, and this result probably may be due to the formation of hydrogen bridges between the glycerol and the hydroxyls of pinocembrin. On the other hand, the ΔH_{trans} has a value of -8.47 kJ mol⁻¹, and this value implies that thermodynamically, it is much more favorable for the vesicles to undergo a change in shape since the appropriate distribution of pinocembrin could stabilize regions of high curvature [38].

Figure 8 shows the SEM microscopies of DMPC with pinocembrin at different concentrations. Based on the observations recorded, it is possible to verify that pinocembrin induces a change in morphology; the liposomes containing a minimum of additive take an almost spherical shape (blue circles), while those rich in pinocembrin are elongated in order to form precursors of the tubular structure (arrowheads).

Fig. 8 SEM microscopies of DMPC with pinocembrin at different concentrations. Circles denote spherical structures; arrowheads point tubular liposomes



The spontaneous radius of curvature of surfactant and lipid assemblies is expressed through the packing parameter (CPP). Amphiphiles with $CPP < 1/3$ tend to aggregate into spherical micelles, $1/3 < CPP < 1/2$ into non-spherical micelles and $CPP > 1/2$ into vesicles like liposomes [39]. The phosphatidylcholines form spherical liposomes because its packing parameter is 0.7. In our study, packing parameter would change due to the existence of domains with different proportions of phospholipid and pinocembrin, thus inducing dissimilarities in the local bilayer

curvature, giving rise to the tubular structure such as it occurs in 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayers doped with ceramide [40].

Since the shape of the particles plays a key role in phagocytosis [41], knowing and controlling the morphology of liposomal formulations is an essential factor in the design of drug delivery systems to either avoid or promote phagocytosis in target tissues.

Kusakabe et al. found that the tubular magnetic liposomes can encapsulate more particles than a spherical

Fig. 9 TEM of DMPC liposomes containing pinocembrin in concentration of **a** blank liposomes, **b** 0.436 mg mL^{-1} , **c** and **d** 0.460 mg mL^{-1} , **e** 0.630 mg mL^{-1} , **f** 0.744 mg mL^{-1} . Purple circles enclose tubular liposomes

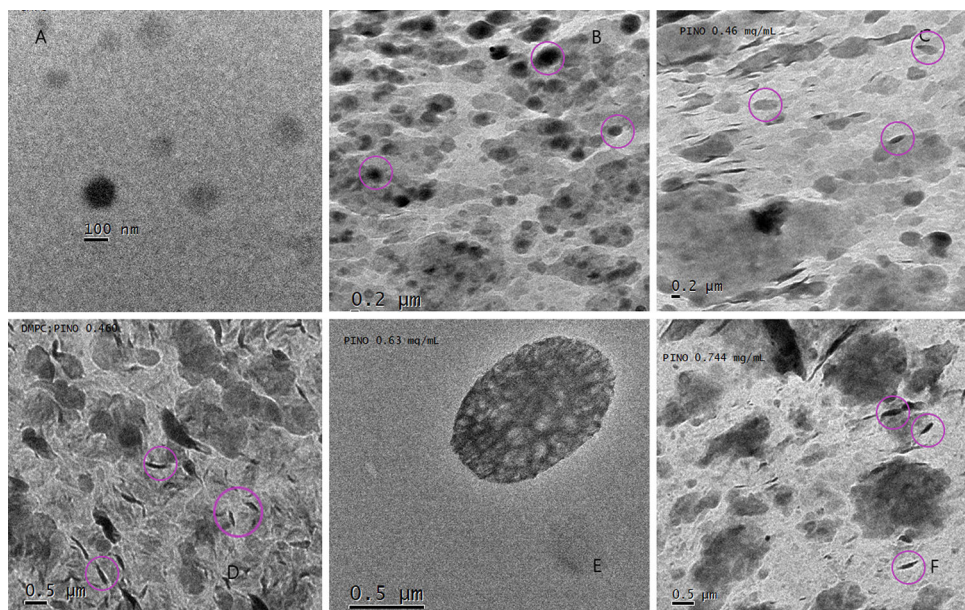
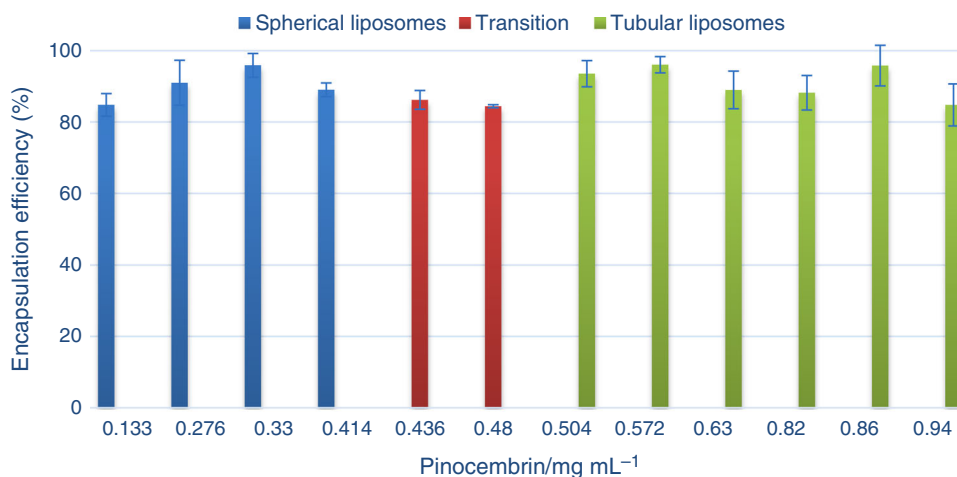


Fig. 10 Encapsulation efficiency (%) of the pinocembrin into liposomes of the different formulations



liposome, which significantly increased the level of cellular association *in vitro* [42]. Svetina and Zeks [43] proposed that change from spherical to tubular liposomes could enhance cell penetration because they are most easily deformable to cross narrow pores.

Tubular liposomes loaded with high concentrations of pinocembrin could improve activity and bioavailability *in vivo* by residing for a longer time in the organism. Further studies are needed in order to fully understand the release mechanism.

TEM images were recorded to confirm the morphology of liposomes before and after to incorporate pinocembrin. The tubular structures were only observed after the ACC (Fig. 9). This suggests that the liposomal bilayer containing pinocembrin was capable of stretching and deforming

its shape in order to accommodate the drug within the membrane.

Efficiency of pinocembrin incorporation

Figure 10 presents the encapsulation efficiency of the pinocembrin into liposomes of the different formulations. We observed a slightly decrease in EE during the phase transition. Subsequently, it increases again until reaching a maximum value of 96%.

The mean incorporation efficiency was $89 \pm 5\%$. The great affinity of pinocembrin for the bilayer is due to the high hydrophobicity of the molecule, whose intrinsic solubility in water was less than $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (data not shown), so that we could take advantage of liposomes in

order to improve the solubility, stability and bioavailability of pinocembrin.

Conclusions

The paper presents a first study of the chemical physical interactions of pinocembrin with phospholipid membranes. It was possible to incorporate pinocembrin to DMPC liposomes with high incorporation efficiency. The flavonoid is in the region that is located between the glycerol and the C1–C8 carbons of the chains of the acyl groups in the lipid membrane, modifying the phase transition profile.

Liposomes containing pinocembrin show a transition from gel phase to reversible liquid crystalline and thermal stability of 10–75 °C.

The incorporation of pinocembrin at different concentrations fluidizes the lipid membrane, diminishing the hydrophobic interactions between phospholipids; accordingly, the enthalpy of melting of the acyl chains decreases.

Pinocembrin is not evenly distributed in the bilayer, and regions with different concentrations are formed causing the phase transition from spherical to tubular liposomes and the concentration at which this process begins can be called additive critical concentration (ACC) where vesicles with different physicochemical properties coexist. The appearance of two signs in the calorimetric trace would imply the presence of two species with different concentrations of pinocembrin to which other researchers have named “domains” with different compositions or separation of lateral phases of the bilayer.

With the results reported in this study, it is possible to conclude that the liposomes formed with DMPC are a viable option as pinocembrin carrier systems to be used as an active substance in the pharmaceutical industry.

Since the literature reports that cholesterol can increase the hydrophobicity in the bilayer and favor the inclusion of hydrophobic molecules, it is necessary to study the incorporation of cholesterol in the formulation. Additional tests of release and in vitro activity would complement the research carried out until now.

Acknowledgements The present work was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT, Grant 270969) and Facultad de Química (PAIP 5000-9020). We are grateful to Rafael Ibarra for his help provided in the language revision, Dra. Josefa Bernard and Dr. Ismael Bustos Jaimes for her support with Nanosizer equipment, Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo, Q.F.B. Tereso Ballado Nava and Dr. Georges Dreyfus for allowing me to use the extruder, Dr. Rafael Ivan Puente Lee from Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI, UNAM) for his assistance in obtaining microscopies and Dr. Efren Hernández for his valuable comments.

References

- Fidler MM, Bray F, Soerjomataram I. The global cancer burden and human development: a review. *Scand J Public Health*. 2018;46:27–36.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359–86.
- Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Res Int*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/379850>.
- Aygun A, Torrey K, Kumar A, Stephenson LD. Investigation of factors affecting controlled release from photosensitive DMPC and DSPC liposomes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;167:743–57.
- Ruddock PS, Charland M, Ramirez S, López A, Towers GHN, Arnason JT, et al. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis*. 2011;38:82–8.
- Chen Z, Rasul A, Zhao C, Millimouno FM, Tsuji I, Yamamura T, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. *Bangladesh J Pharmacol*. 2013;8:255–62.
- Charoensin S, Punvittayagul C, Pompimon W, Mevatee U, Wongpoomchai R. Toxicological and clastogenic evaluation of pinocembrin and pinostrobin isolated from *Boesenbergia pandurata* in Wistar rats. *Thai J Toxicol*. 2010;25:29–40.
- Liu R, Gao M, Yang ZH, Du GH. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro. *Brain Res*. 2008;1216:104–15.
- Zheng Y, Wang K, Wu Y, Chen Y, Chen X, Hu CW, et al. Pinocembrin induces ER stress mediated apoptosis and suppresses autophagy in melanoma cells. *Cancer Lett*. 2018;431:31–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.026>.
- Lan X, Wang W, Li Q, Wang J. The natural flavonoid pinocembrin: molecular targets and potential therapeutic applications. *Mol Neurobiol*. 2016;53:1794–801. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9125-2>.
- Liu R, Li JZ, Song JK, Zhou D, Huang C, Bai XY, et al. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiol Aging*. 2014;35:1275–85. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.031>.
- Lan X, Han X, Li Q, Li Q, Gao Y, Cheng T, et al. Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia. *Brain Behav Immun*. 2017;61:326–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.012>.
- Stefanutti E, Papacci F, Sennato S, Bombelli C, Viola I, Bonincontro A, et al. Cationic liposomes formulated with DMPC and a gemini surfactant traverse the cell membrane without causing a significant bio-damage. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014;1838:2646–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.026>.
- Moreno MM, Garidel P, Suwalsky M, Howe J, Brandenburg K. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2009;1788:1296–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.016>.
- Basso LGM, Rodrigues RZ, Naal RMZG, Costa-Filho AJ. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*.

- 2011;1808:55–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2010.08.009>.
16. Wu FG, Wu RG, Sun HY, Zheng YZ, Yu ZW. Demixing and crystallization of DODAB in DPPC-DODAB binary mixtures. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16:15307–18.
 17. Wu FG, Wang NN, Yu JS, Luo JJ, Yu ZW. Nonsynchronicity phenomenon observed during the Lamellar–Micellar phase transitions of 1-stearoyllysophosphatidylcholine dispersed in water. *J Phys Chem B*. 2010;114:2158–64.
 18. Wu FG, Jia Q, Wu RG, Yu ZW. Regional cooperativity in the phase transitions of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: the lipid tail triggers the isothermal crystallization process. *J Phys Chem B*. 2011;115:8559–68.
 19. Mady MM, Shafaa MW, Abbase ER, Fahium AH. Interaction of doxorubicin and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62:481–6.
 20. Di Foggia M, Bonora S, Tinti A, Tugnoli V. DSC and Raman study of DMPC liposomes in presence of ibuprofen at different pH. *J Therm Anal Calorim*. 2017;127:1407–17.
 21. Taylor KMG, Morris RM. Thermal analysis of phase transition in liposomes behaviour. *Thermochim Acta*. 1995;248:289–301.
 22. Ohline SM, Campbell ML, Turnbull MT, Kohler SJ. Differential scanning calorimetric study of bilayer membrane phase transitions. A biophysical chemistry experiment. *J Chem Educ*. 2001;78:1251. <https://doi.org/10.1021/ed078p1251>.
 23. Lentz BR, Barenholz Y, Thompson E. Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. I. Single component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry*. 1976;15:4521–8.
 24. Jain MK, Wu NM. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. *J Membr Biol*. 1977;34:157–201.
 25. Harris JS, Epps DE, Davio SR, Kézdy FJ. Evidence for transbilayer, tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoyl glycerophosphocholine liposomes. *Biochemistry*. 1995;34:3851–7.
 26. El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. *Int J Pharm*. 2005;292:179–85.
 27. Pruchnik H. Influence of cytotoxic butylin complexes with 2-sulfobenzoic acid on the thermotropic phase behavior of lipid model membranes. *J Therm Anal Calorim*. 2017;127:507–14.
 28. Wei X, Patil Y, Ohana P, Amitay Y, Shmeeda H, Gabizon A, et al. Characterization of pegylated liposomal mitomycin c lipid-based prodrug (promitil) by high sensitivity differential scanning calorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. *Mol Pharm*. 2017;14:4339–45.
 29. Momo F, Fabris S, Stevanato R. Interaction of fluoxetine with phosphatidylcholine liposomes. *Biophys Chem*. 2005;118:15–21.
 30. Garidel P, Johann C, Blume A. Thermodynamics of lipid organization and domain formation in phospholipid bilayers. *J Liposome Res*. 2000;10:131–58.
 31. Subczynski WK, Wisniewska A, Subczynski WK, Wisniewska A, Yin JJ, Hyde JS, et al. Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. *Biochemistry*. 1994;33:7670–81.
 32. Arrowsmith M, Hadgraft J, Kellaway IW. The interaction of cortisone esters with liposomes as studied by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm*. 1983;16:305–18.
 33. Fildes FJT, Oliver JE. Interaction of cortisol-21-palmitate with liposomes examined by differential scanning calorimetry. *J Pharm Pharmacol*. 1978;30:337–42.
 34. Wu RG, Wang YR, Wu FG, Zhou HW, Zhang XH, Hou JL. A DSC study of paeonol-encapsulated liposomes, comparison the effect of cholesterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior of liposomes. *J Therm Anal Calorim*. 2012;109:311–6.
 35. Zhang W, Wang Z, Wu C, Jin Y, Liu X, Wu Z, et al. The effect of DSPE-PEG2000, cholesterol and drug incorporated in bilayer on the formation of discoidal micelles. *Eur J Pharm Sci*. 2018;125:74–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.013>.
 36. Neunert G, Tomaszewska-Gras J, Siejak P, Pietralik Z, Kozak M, Polewski K. Disruptive effect of tocopherol oxalate on DPPC liposome structure: DSC, SAXS, and fluorescence anisotropy studies. *Chem Phys Lipids*. 2018;216:104–13.
 37. Edwards K, Johnsson M, Karlsson G, Silfvander M. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophys J*. 1997;73:258–66. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78066-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78066-4).
 38. Mui BL, Döbereiner HG, Madden TD, Cullis PR. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys J*. 1995;69:930–41.
 39. Li X-C, Ferreira D, Ding Y. Determination of absolute configuration of natural products: theoretical calculation of electronic circular dichroism as a tool. *Curr Org Chem*. 2010;14:1678–97.
 40. Xu P, Tan G, Zhou J, He J, Lawson LB, McPherson GL, et al. Undulating tubular liposomes through incorporation of a synthetic skin ceramide into phospholipid bilayers. *Langmuir*. 2009;25:10422–5.
 41. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:4930–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600997103>.
 42. Sakuragi M, Taguchi K, Kusakabe K. Structural and biological characterization of Fe₃O₄-loaded spherical and tubular liposomes for use in drug delivery systems. *Jpn J Appl Phys*. 2017;56:055002.
 43. Svetina S, Žekš B. Shape behavior of lipid vesicles as the basis of some cellular processes. *Anat Rec*. 2002;268:215–25.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Simultaneous encapsulation of hydrophilic and lipophilic molecules in liposomes of DSPC

Mariana R. Romero-Arrieta, Elizabeth Uria-Canseco*, Silvia Perez-Casas*

Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

DSC
Cancer
Pinocembrin
Resazurin
Nanocarrier

ABSTRACT

This study shows simultaneous incorporation of two hydrophobic molecules and a hydrophilic molecule into distearoylphosphatidylcholine (DSPC) liposomes. Pinocembrin and cholesterol are incorporated in the lipidic membrane while resazurin is encapsulated in the aqueous center. The thermotropic behavior of liposomes as a function of the additives was studied with differential scanning calorimetry and the morphology was observed by SEM. A high percentage of entrapment was found for different concentrations of pinocembrin. Cholesterol does not interfere with the incorporation efficiency of pinocembrin and improves the distribution in the membrane but decreases the dissolution stability of liposomes due to steric hindrance in the bilayer. Encapsulation efficiency of resazurin was close to 50%. This molecule also interacts with the polar heads of the phospholipids. This research offers an alternative formulation by using DSPC liposomes as carrier of molecules with different polarity to evaluate the cytotoxicity of pinocembrin in cancer cell lines.

1. Introduction

Pinocembrin (5,7-dihydroxyflavanone) is a primary flavonoid isolated from different plant varieties, it is also found in high concentrations in different types of honeys [1], besides being the most abundant chiral flavonoid in propolis, the resinous substance produced by honeybees [2]. The wide range of pharmacological activities include antimicrobial [3], anti-inflammatory [4], antioxidant [5] and anticancer [6–8] activities, making it a viable alternative to be used as an active ingredient in the treatment of various chronic degenerative diseases.

The ideal test for *in vitro* cell proliferation and cytotoxicity should be simple, fast, efficient, reliable, sensitive, safe and cost-effective, without interfering with the compound that is used as an active ingredient [9]. Such purpose could be achieved by using resazurin; which is a highly hydrophilic molecule that has been used to evaluate the cytotoxicity of flavonoids against cell lines of cancers that are resistant to multiple drugs [10].

Many biological properties of the flavonoids may be related to their capacity to penetrate into cell membranes and to affect the membrane activity [11]. However, the application of pinocembrin in clinical practice is very limited due to its low solubility in water and therefore its bioavailability [12]. These disadvantages could be overcome by using liposomes as molecular carriers. One of the most versatile structures in the field of pharmaceutical study are the liposomes, which

consist of spherical vesicles formed by concentric lipid bilayers that enclose an aqueous nucleus. Liposomes can be used as drug carriers encapsulating hydrophilic molecules in the aqueous center of the liposome and hydrophobic molecules in the bilayer of phospholipids [13].

In the present study, a liposomal formulation is proposed to be used in the pharmaceutical industry for the treatment of cancer by using distearoylphosphatidylcholine (DSPC) as the main component. Other ingredients such as cholesterol and resazurin could improve the formulation and potentiate its application. Numerous studies about the use of cholesterol [14–17] as a stabilizer show that this steroid can increase the bundling of phospholipid molecules, reduces the permeability of the bilayer to electrolytes and non-electrolyte solutes and improves the resistance of vesicles to aggregate.

A physicochemical study of the incorporation of pinocembrin and cholesterol (hydrophobic molecules) inside the lipid bilayer of DSPC liposomes, as well as the simultaneous encapsulation of resazurin (hydrophilic molecule) in the aqueous center was carried out. Thermodynamic parameters, transition enthalpy (ΔH), transition temperature (T_m) and molecular cooperativity ($\Delta T_{1/2}$) of the formulations were quantified by Differential Scanning Calorimetry (DSC). Additionally, dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM) studies were carried out to study dissolution stability, morphology and lamellarity of the liposomal systems.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: elizabeth@tcp.mx (E. Uria-Canseco), silpeca@unam.mx (S. Perez-Casas).

<https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178462>

Received 13 May 2019; Received in revised form 10 November 2019; Accepted 12 November 2019

0040-6031/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Properties of chemicals reagents.

Reagents	Notation	Purity* (%)	Source	Batch
Ethanol	–	> 99	Baker	9000-02
Distearoylphosphatidylcholine	DSPC	99	Sigma	120H8368
Pinocembrin	PINO	95	Sigma-Aldrich	MKCF0471
Cholesterol	CHOL	98	Aldrich	OL217HM
Chloroform anhydrous	–	> 99	Sigma-Aldrich	SHBD3579V
Resazurin sodium salt	RES	80	Sigma-Aldrich	MKBZ4934V

* As stated by supplier.

2. Experimental

2.1. Materials

Table 1 shows the properties of the reagents used in this research. Fig. 1 shows the structures of DSPC, pinocembrin, cholesterol and resazurin.

2.2. Preparation of liposomes

Thin film hydration technique was used [18]. Briefly, the phospholipid is dissolved in chloroform together with the non-polar molecules of the formulation. The solvent is evaporated to dryness (85 °C, 70 rpm) by using a rotary evaporator and a vacuum pump, obtaining on the walls of the flask a thin film formed by the lipid bilayer, the dissolved hydrophobic molecules are retained in the film, in this case pinocembrin and cholesterol. Subsequently, the lipid bilayer is hydrated with distilled and deionized water (Barnstead Nanopure Infinity, with a resistivity of 18 MΩ·cm) or with an aqueous solution that contains resazurin at 60 °C, the liposomal suspension is sonicated for 30 min.

The liposomes obtained with this methodology are mainly small unilamellar vesicles (SUV) but since they are formed spontaneously, there is no direct control of the obtained size, therefore, the technique was supplemented with extrusion (Lipex Extruder, Northern Lipids Inc, Canada). The vesicles were passed 25 times through a polycarbonate filter with a pore size of 100 nm at a pressure of 100–200 psi. Fig. 2 schematizes the experimental procedure.

Liposomes (10 mM in milli-Q water) were prepared with different concentrations of pinocembrin, cholesterol and resazurin. The Z potential, size (hydrodynamic diameter) and dissolution stability were monitored by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK) equipment. The morphology of the systems under study was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM), JEOL JSM-5900-LV (Jeol, USA). Prior to the

experiment, the liposomal suspension was diluted 1:200 in milli-Q water. Gold coating, high vacuum and retro-dispersed electron detector were used in SEM.

2.3. DSC

Differential scanning calorimetry measures the thermotropic behavior of liposomes according to their content. Various investigations have shown that the thermal profile of pure vesicles is modified when an additive is inserted between the lipid membrane or if there is an interaction with the polar heads of the liposome [9,19,20].

VP-DSC microcalorimeter system (Malvern, USA) was used. In the thermal analysis, 515 μL were injected into each cell. The heating-cooling-heating cycles were recorded until identical heating traces, indicated that equilibrium had been reached, to ensure the reversibility of the phase transition. The temperature range was 25° to 70 °C with a pressure of 35 psi, the scan rate was 90 °C/hour with a filtering period of 10 s. The sample and the reaction medium (milli-Q water) were degassed for 15 min before being injected into the cells. To calibrate the equipment, a baseline was obtained using milli-Q water in both cells. The baseline was subtracted from the thermal profile of the liposomal systems using Origin Pro 8.5 Partition Software. Thermodynamic parameters were obtained with this program. When two or more peaks appear, deconvolutions were done. The main transition temperature (T_m), where the heat capacity (C_p) reaches its maximum value, corresponds to the phase transition from gel to liquid-crystalline. The phase transition enthalpy (ΔH), normalized per mol of phospholipid, is determined by integrating the area under the peak. $\Delta T_{1/2}$ is the temperature width at half peak height, this parameter is very sensitive to the presence of any additives. It is taken as a measure for the cooperativity of the transition [21]. During the heating, the gel stage of the lipids experiences a pre-transition to the “rippled” gel phase, which occurs between 5–10 °C below the main transition, with a small enthalpy. This behavior has been associated with the rotation of the polar heads or cooperative movement of the hydrocarbon chain before melting [22]. The change in entropy at a transition temperature is usually defined as follows in Eq. 1 [23–25]:

$$\Delta S = \Delta H / T_m \quad (1)$$

2.4. Entrapment efficiency

Resazurin and pinocembrin absorb in the UV–vis spectrum. Standard curves were measured in ethanol-water (5 % v/v), measuring the absorbance as a function of the concentration, at 290 nm for pinocembrin and at 610 nm for resazurin (Fig. 3). The amount of additive in the liposomal formulations was determined with the equations obtained, pinocembrin (Eq. 2, $r = 0.9987$) and resazurin (Eq. 3,

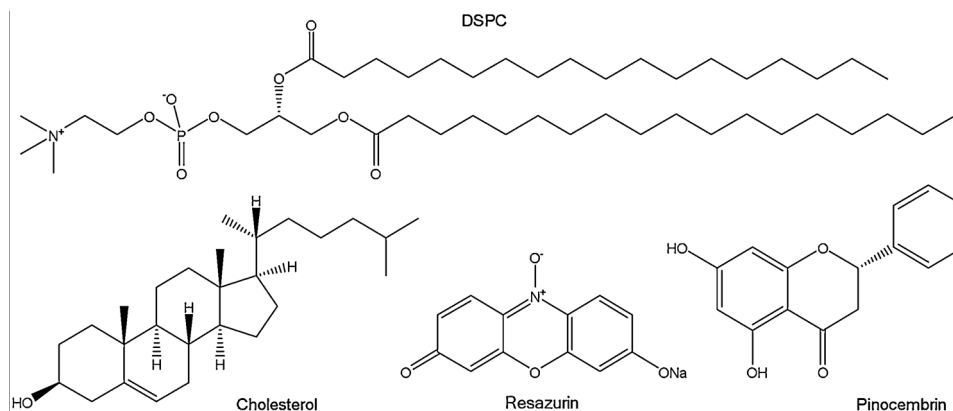


Fig. 1. Chemical structures of distearoylphosphatidylcholine (DSPC), pinocembrin, cholesterol and resazurin.

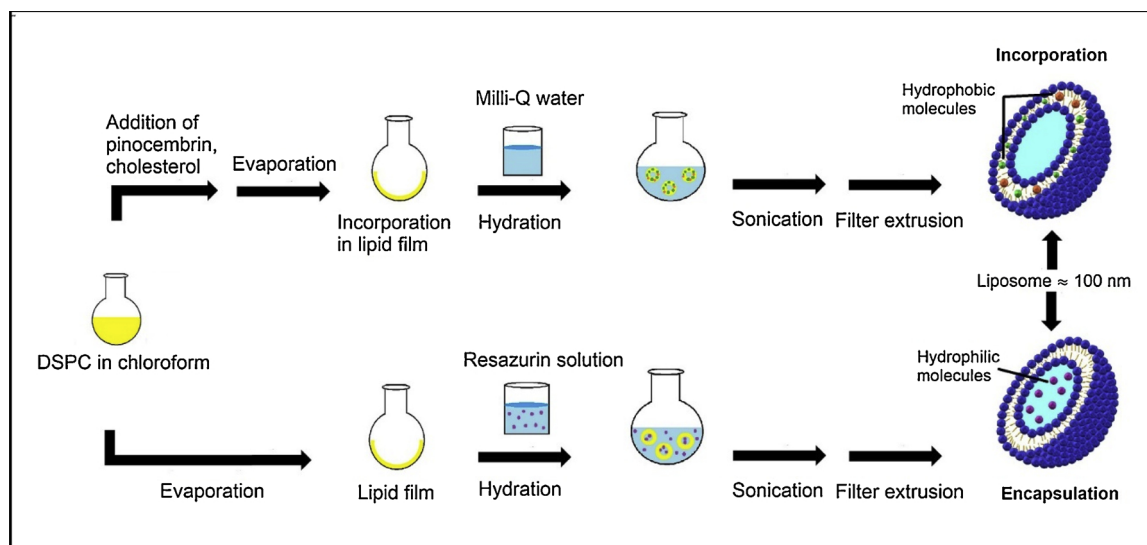


Fig. 2. Hydrophobic drug incorporation and hydrophilic drug encapsulation by thin film hydration followed by sonication and extrusion.

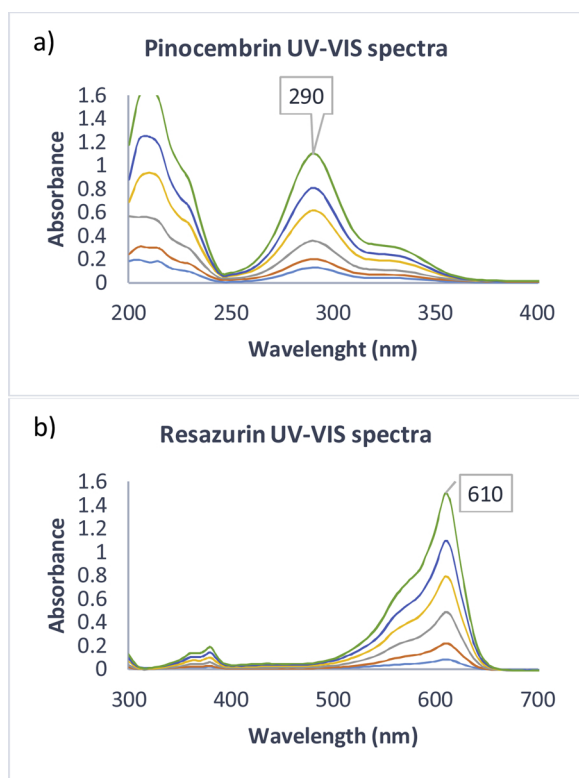


Fig. 3. UV-vis absorption spectra of (a) pinocembrin (1.4–15.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and (b) resazurin (1.4–15.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in ethanol-water 5 % v/v.

$r = 0.9996$. C_{pino} is the concentration of pinocembrin in $\mu\text{g}/\text{mL}$ and C_{res} is the concentration of resazurin in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

$$A_{290\text{nm}} = 0.0966 C_{\text{pino}} - 0.0035 \quad (2)$$

$$A_{610\text{nm}} = 0.0883 C_{\text{res}} + 0.0005 \quad (3)$$

Incorporation efficiency (IE) refers exclusively to the load of lipophilic compounds inserted in the lipid bilayer and is defined as the concentration of incorporated material over the initial concentration used to prepare the formulation. Eq. 4 was used for the IE determination of Pinocembrin [26]:

$$\text{IE} (\%) = [(C_{\text{pino, total}} - C_{\text{pino, non incorporated}}) / C_{\text{pino, total}}] * 100 \quad (4)$$

Encapsulation efficiency (EE) is defined as the amount of material captured in the aqueous center of liposomes in relation to the total amount of material added during the preparation process. In this study, the determination of encapsulation of Resazurin is defined by Eq. 5 [27]:

$$\text{EE} (\%) = [C_{\text{res, encapsulated}} / C_{\text{res, total}}] * 100 \quad (5)$$

To determine the amount of pinocembrin and resazurin entrapped in the liposomes, Amicon Ultra-0.5[®] filters were used, which are characterized by their ability to retain molecules above a specific molecular weight. Aliquots of 500 μL of liposomal suspension are placed in the filtration device, the sample was centrifuged at 15,000 rpm. Free drug is recovered in the collecting tube while the liposomes with the entrapped drugs are retained in the filter. To quantify the drugs in the liposome, reverse spin step is used, this methodology consists in re-constituting the concentrate to the original volume of the sample, and the inverted filter is placed in a clean collecting tube and centrifuged for 2 min at 15,000 rpm to transfer the sample to the collecting tube (UserGuideAmicon[®]). An aliquot is taken, dissolved in ethanol and absorbance measured at the corresponding wavelength (Fig. 4).

2.5. Stability

After the production of each liposomal formulation, these were kept in refrigeration at 4 $^{\circ}\text{C}$. The size of liposomes was measured from day 1 after preparation until the appearance of a visible precipitate.

3. Results

3.1. Incorporation of Pinocembrin

Fig. 5 shows the thermal profile of the liposomes that contain pinocembrin in concentrations from 0 to 0.49 mg/mL . The calorimetric trace of the pure DSPC corresponds to a narrow peak due to the highly cooperative interaction between the lipid molecules. The transition from gel phase to liquid-crystalline phase of the pure DSPC occurs at 53.8 $^{\circ}\text{C}$, in agreement with the data reported in the literature [23,28,29]. When pinocembrin is added, the calorimetric trace changes, showing a strong interaction between the acyl chains of the lipid bilayer and pinocembrin. The T_m moves to lower values, in other words, the liquid-crystalline phase is favored; in addition, the maximum C_p decreases, the peak widens and deforms due to decreasing cooperativity.

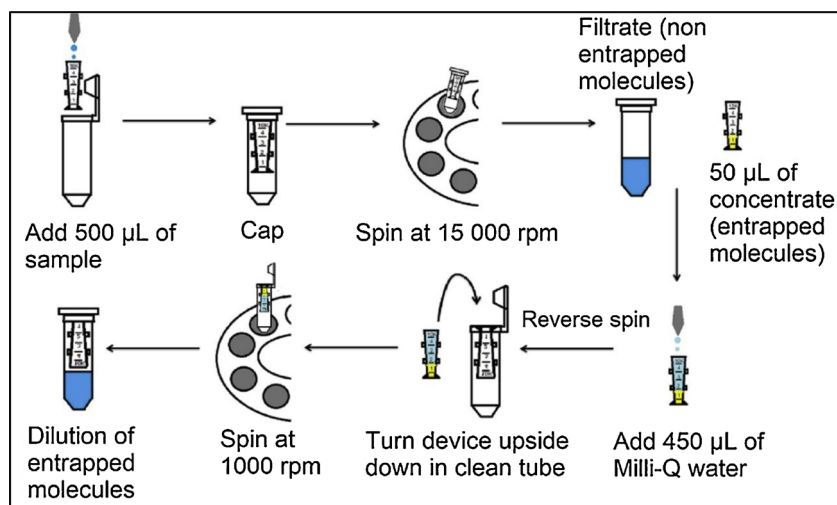


Fig. 4. Ultrafiltration method using centrifugal filter devices for removing non-entrapped molecules in the liposomes and recovering the concentrated sample (retained species) using a reverse spin step.

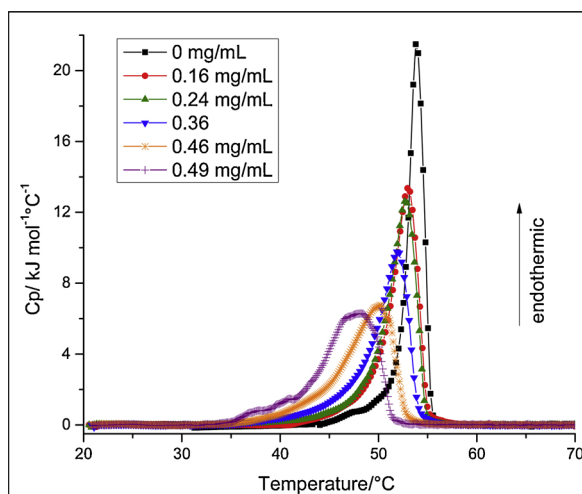


Fig. 5. DSC heating curves of DSPC with different concentrations of pinocembrin, from 0 to 0.49 mg/mL.

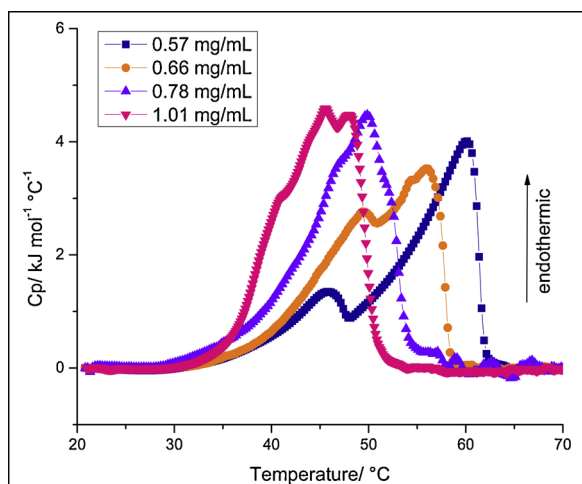


Fig. 6. DSC heating curves of DSPC at different concentrations of pinocembrin, from 0.57–1.01 mg/mL.

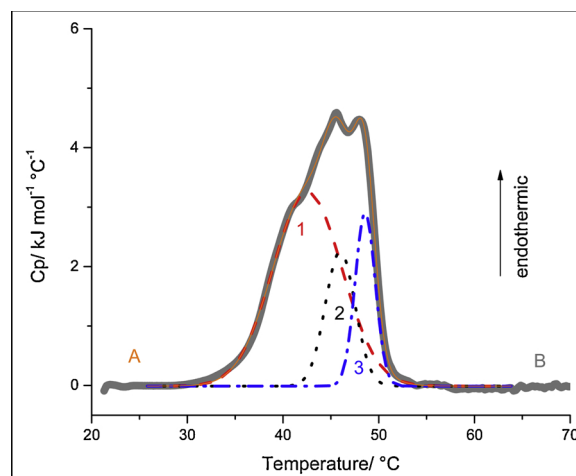


Fig. 7. Deconvoluted DSC heating trace of DSPC with 1.01 mg/mL of pinocembrin. A) DSC heating trace (solid gray line); B) Cumulative Fit Peak (solid orange line); 1) Fit peak 1 (dashed red line); 2) Fit peak 2 (dotted black line); 3) Fit peak 3 (dash-dotted blue line). The adjustment of the model to the experimental data corresponds to three peaks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Jain & Wu [30] suggest the magnitude of the effect induced by an additive depends on the concentration, therefore, the greater amount of pinocembrin incorporated in the bilayer, the greater the modification of the transition peak. From 0.57–1.01 mg/mL of pinocembrin, more than one peak can be seen (Fig. 6), so we infer that there are species with different concentrations of pinocembrin distributed randomly [31]. Similar behavior has been observed in other studies with lecithins [19,20]. Since the calorimetric trace is reproduced only after three scans the cooling and heating process, we infer that the process is reversible and that such domains coexist regardless of the temperature applied to the system.

Based on the results obtained, we can assume that the regions, where the first molecules of pinocembrin are hosted, change their hydrophobicity and have a lower degree of packing [32]; consequently, addition of more molecules of the additive will be easier to incorporate in that region, thus beginning the formation of domains, which are continuously saturated until reaching a maximum concentration. In previous studies, we named the point where the formation of domains begins as the critical concentration of the additive (CCA) [33].

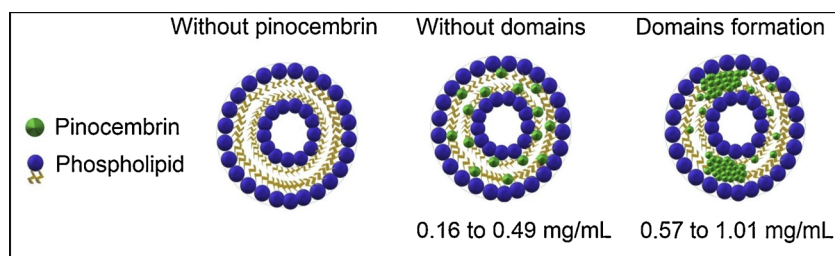


Fig. 8. Schematic representation of the distribution of pinocembrin in the lipid bilayer. At low concentrations (0.16 to 0.36 mg/mL) pinocembrin is homogeneously distributed among the phospholipids, the shape of the DSC trace is kept. At concentrations of 0.46 and 0.49 mg/mL, pinocembrin begins to accumulate in certain regions of the membrane, the DSC trace is wide and asymmetric. From concentrations of 0.57 mg/mL, rich and poor domains are formed in pinocembrin, two or more peaks appear in the thermogram (Figs. 5 and 6).

Table 2

Stability in solution at 4 °C and Calorimetric parameters of DSPC liposomes at a concentration from 0 to 1.01 mg/mL of pinocembrin. The transition temperature (T_m), transition enthalpy (ΔH), entropy change (ΔS) and temperature width at half peak height ($\Delta T_{1/2}$).

Pinocembrin/ mg mL ⁻¹		$\Delta H/ \text{kJ mol}^{-1}$	$T_m/ ^\circ\text{C}$	$\Delta T_{1/2}/ ^\circ\text{C}$	$\Delta S/ \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	Stability in solution /days
0		42.5 ± 3.4	53.8 ± 0.1	1.6 ± 0.5	130.1 ± 10.4	60
0.16		51.3 ± 0.3	52.9 ± 0.0	3.3 ± 0.4	157.4 ± 0.9	23
0.24		51.9 ± 0.9	52.7 ± 0.1	3.5 ± 0.2	159.3 ± 3.3	17
0.36		47.4 ± 0.5	51.9 ± 0.1	4.2 ± 0.5	145.9 ± 2.0	20
0.46		46.2 ± 1.0	50.3 ± 0.2	5.6 ± 0.2	142.84 ± 3.7	12
0.49		47.7 ± 0.6	48.2 ± 0.1	6.5 ± 0.1	148.4 ± 2.3	18
0.57*	Peak 1	33.3 ± 1.9	44.6 ± 0.5	16.1 ± 0.3	104.9 ± 6.9	19
	Peak 2	20.5 ± 0.3	60.6 ± 0.3	4.7 ± 0.0	61.4 ± 1.1	
0.66*	Peak 1	33.0 ± 0.6	48.8 ± 0.6	10.7 ± 0.8	102.5 ± 2.2	21
	Peak 2	11.2 ± 1.0	55.6 ± 0.1	3.5 ± 0.3	34.1 ± 3.66	
0.78*	Peak 1	25.8 ± 2.5	44.8 ± 0.8	9.5 ± 0.5	81.1 ± 9.13	12
	Peak 2	19.0 ± 2.2	49.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2	58.8 ± 8.1	
1.01*	Peak 1	20.3 ± 0.8	41.4 ± 0.1	5.9 ± 0.2	64.5 ± 2.93	7
	Peak 2	18.5 ± 1.3	46.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	58.0 ± 4.8	
	Peak 3	5.6 ± 0.4	48.7 ± 0.0	1.9 ± 0.0	17.4 ± 1.5	

* DSC heating trace with two or more peaks.

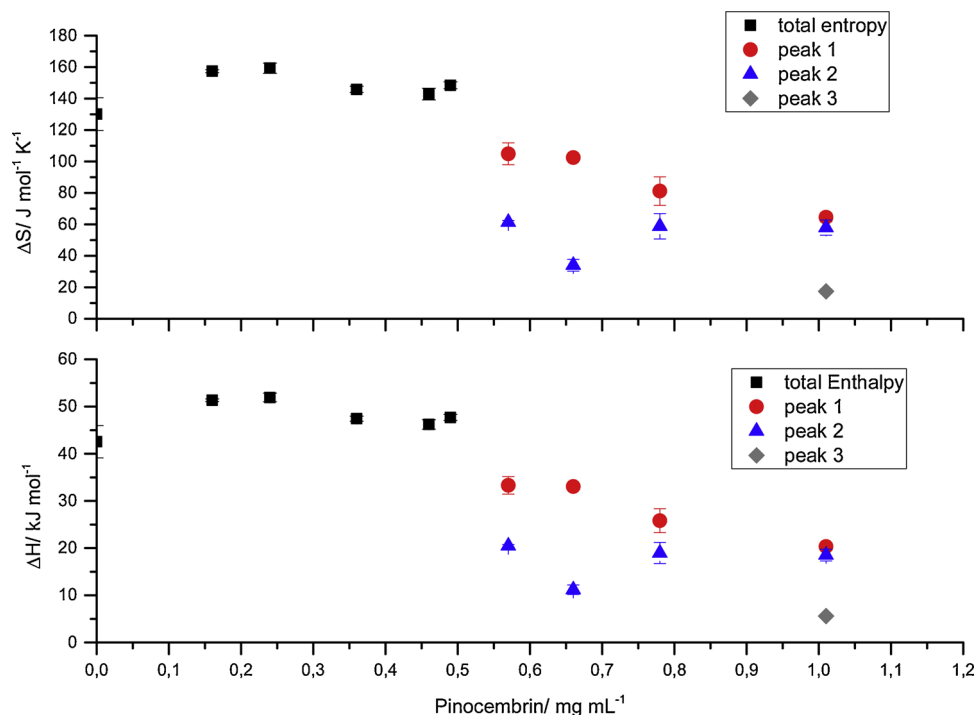


Fig. 9. Enthalpy and entropy change of phase transition of DSPC liposomes with different concentrations of pinocembrin.

The appearance of a third peak in the DSPC calorimetric trace with 1.01 mg/mL of pinocembrin (Fig. 7) suggests that given the length of the lipid chain, it is possible that more than two regions with different concentrations of pinocembrin coexist, giving rise to several structures, spherical and tubular, as shown below in Fig. 13. By adding more pinocembrin, the system flocculates in less than 7 days due to the excess

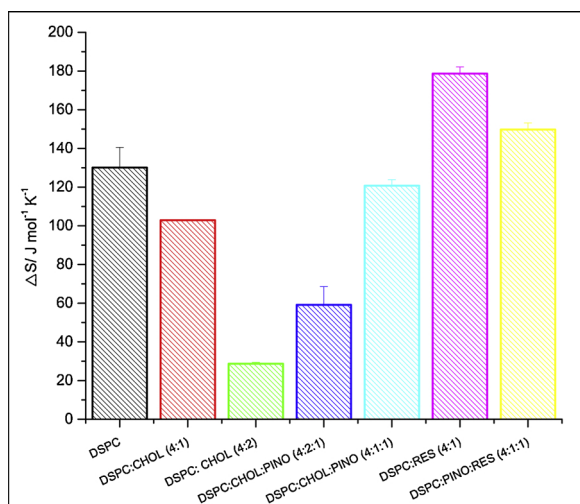
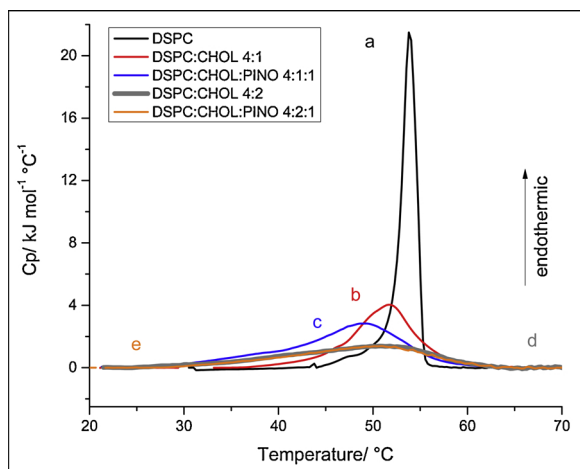
of additive in the bilayer, so we can assume that the membrane is close to saturation. Fig. 8 shows schematically the distribution of pinocembrin in the bilayer and the formation of domains.

Table 2 displays the thermodynamic parameters and the dissolution stability of the DSPC liposomes with different concentrations of pinocembrin. The thermal profiles that presented more than one signal were

Table 3

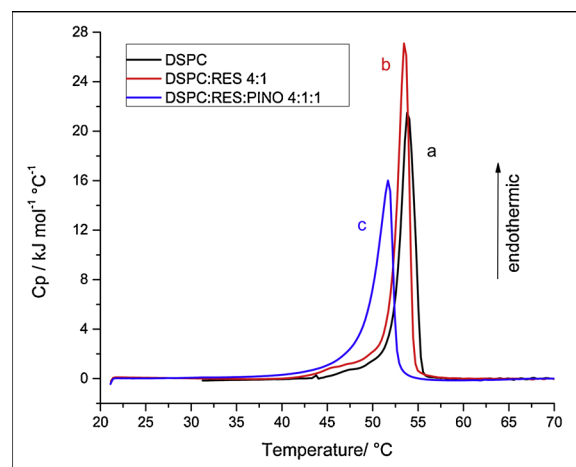
Size, polydispersity index (PDI) and Calorimetric parameters of DSPC liposomes containing cholesterol (CHOL), pinocembrin (PINO) and resazurin (RES).

Formulation (Molar Ratio)	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$T_m / ^\circ\text{C}$	$T_{1/2} / ^\circ\text{C}$	Size/ nm	PDI
DSPC	42.5 ± 3.4	130.1 ± 10.4	53.8 ± 0.1	1.6 ± 0.5	97 ± 0	0.08 ± 0.01
DSPC:CHOL (4:1)	33.4 ± 0.1	102.9 ± 3.8	51.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1	91 ± 10	0.15 ± 0.01
DSPC:CHOL (4:2)	9.3 ± 0.3	28.7 ± 7.4	51.8 ± 0.3	13.0 ± 0.7	94 ± 11	0.21 ± 0.02
DSPC:CHOL:PINO (4:2:1)	19.1 ± 3.2	59.1 ± 9.5	49.9 ± 1.9	16.1 ± 1.0	86 ± 1	0.14 ± 0.01
DSPC:CHOL:PINO (4:1:1)	38.9 ± 1.1	120.7 ± 3.13	49.3 ± 0.5	11.3 ± 0.3	87 ± 1	0.45 ± 0.02
DSPC:RES (4:1)	58.4 ± 0.9	178.7 ± 3.42	53.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0	432 ± 27	0.34 ± 0.08
DSPC:PINO:RES (4:1:1)	48.6 ± 0.9	149.8 ± 3.43	51.6 ± 0.1	2.2 ± 0.0	116 ± 4	0.18 ± 0.00

**Fig. 10.** Entropy change for liposomal systems with cholesterol and resazurin.**Fig. 11.** Overlapped heating thermograms of liposomes with pinocembrin (PINO) and cholesterol (CHOL). (a) Pure DSPC; (b) DSPC:CHOL 4:1; (c) DSPC:CHOL:PINO 4:1:1; (d) DSPC:CHOL 4:2; (e) DSPC:CHOL:PINO 4:2:1.

divided into two or more contributions by a deconvolution using Origin Pro software, these are identified by an asterisk.

The value of $\Delta T_{1/2}$ increases with increasing concentration of pinocembrin. This result can be associated with the decrease of cooperativity [34]. When the bilayer is in the gel stage, the movement in a fatty acid chain is transmitted to a certain extent to the adjacent chains, and so on to several molecules that form a cooperative unit. As the temperature increases, the conformational changes of the pure phospholipid can be transmitted to a substantial part of the cooperative unit. However, pinocembrin blocks this transmitter system, so the cooperative movement of the chains is rapidly damped, causing the changes in the membrane to remain relatively local rather than

**Fig. 12.** DSC heating trace of DSPC liposomes with pinocembrin (PINO) and resazurin (RES). (a in black) Pure DSPC; (b in red) DSPC:RES 4:1; (c in blue) DSPC:RES:PINO 4:1:1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

involving the cooperative unit as a whole [35].

After deconvoluting the calorimetric trace, it is possible to identify which of the signals contains the highest amount of pinocembrin and the contribution to the total thermodynamic parameters. Since the value of $\Delta T_{1/2}$ is proportional to the amount of additive incorporated, the peak with a greater $\Delta T_{1/2}$ contains more pinocembrin and is more fluid, so T_m is lower (Table 2).

Table 2 shows an increase in the enthalpy is observed, with regard to the pure liposome, when pinocembrin is incorporated at low concentrations ($< 0.57 \text{ mg mL}^{-1}$). We suggest that the guest molecules interact favorably with the lipid chains, conferring tightly packed in highly ordered crystal-like structure organization to the bilayer [36]. In the structure of pinocembrin there is a stereogenic center; studies report that a molecule that contains such characteristic presents structural rigidity [37]; therefore, the presence of the flavonoid restricts the movement of the phospholipid chains, causing them to have more hydrophobic interactions, requiring more energy to break them.

Subsequently, when pinocembrin begins to accumulate in certain regions, the transition enthalpy of the domain rich in pinocembrin decreases (peak 1), which could indicate that this region is more fluid and that the phospholipid-phospholipid interactions, mainly de van der Waals, have been significantly reduced. On the other hand, the enthalpy of the domain poor in pinocembrin (peak 2) diminishes when increasing the amount of additive; later, the enthalpy increases, reaches a maximum, and begins to decrease slightly (Fig. 9). This behavior is like empty liposomes, which suggests that domains are gradually enriched.

Pinocembrin incorporation among acyl chains increases entropy therefore decreases phospholipids ordering (Fig. 9), those changes allow to host more additive molecules. When pinocembrin starts forming clusters, entropy slightly decreases. When phase separation is observed, entropy decreases drastically due to ordered poor and rich

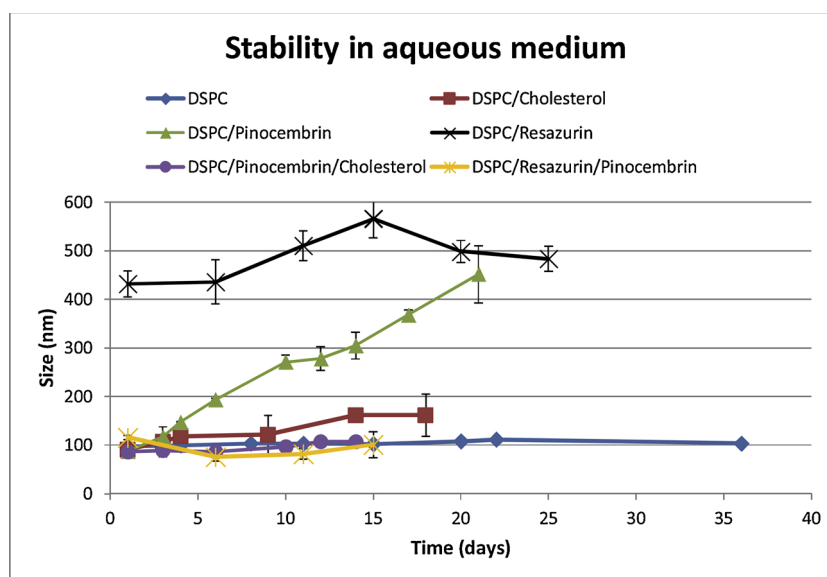


Fig. 13. Size of the liposomal systems as a function of time. The experimental points are presented linked by a straight line for a better visualization.

pinoembrin domains formation; as it is shown in Fig. 6, where a second peak is found at pinoembrin concentration of 0.57 mg/mL. Because pinoembrin tends to be hosted in the same region, the entropy of peak 1, which contains more additive, gradually diminishes. In the other hand, entropy of peak 2 falls significantly supporting the idea that a new phase with different composition or structure is forming; consequently, a third peak appears (Fig. 7).

3.2. Incorporation of cholesterol

The addition of cholesterol in the liposomal formulations plays a very important role, the adequate amount of this steroid can modify the fluidity, stability, encapsulation ability of lipid membranes and release of guests [13]. The literature reports that cholesterol can increase the hydrophobicity in the bilayer and favor the inclusion of hydrophobic molecules [32].

By incorporating cholesterol at molar ratios of DSPC:CHOL 4:1 and 2:1, the T_m decreases, and some destabilization of the bilayer occurs, changing the phospholipid-phospholipid interactions, so the enthalpy and cooperativity are lower in comparison with the pure phospholipid (Table 3). Again, the result depends on the amount of additive.

When pinoembrin and cholesterol are incorporated together, DSPC:CHOL:PINO 4:1:1, the DSC trace presents a single peak whose ΔH value decreases drastically with regard to the empty liposome (Fig. 11), which means that the sample is mostly fluid when it contains a large amount of additives in the bilayer. When increasing the concentration of cholesterol, DSPC:CHOL:PINO 4:2:1, the calorimetric curve is similar to DSPC:CHOL 4:2. Probably, because cholesterol is a more lipophilic molecule and since the last carbons of the acyl chain are slightly disordered (C14-C18), the incorporation of pinoembrin in this region does not significantly affect the value of the enthalpy. In addition, cholesterol could act as a structural spacer, avoiding the presence of domains with different concentrations within the liposome, therefore, the two peaks in the thermogram with high concentrations of cholesterol and pinoembrin are not observed. When both molecules are in the membrane, we suggest that pinoembrin is localized outside of the cooperative zone, C1-C8 [38], or it fills the empty spaces among the phospholipid molecules and cholesterol.

Lamprou et. al. reports that cholesterol increases the order of the phospholipids [13] so it is possible that it allows a more uniform distribution of pinoembrin in the bilayer, avoiding aggregation and favoring the intermolecular forces between pinoembrin and DSPC. This

phenomenon has been observed in formulations containing DPPC/paclitaxel/cholesterol, in which cholesterol favors a more condensed system [39]. In Fig. 10, entropy decrease is observed in liposomal systems containing cholesterol, these findings are consistent with hypothesis described above.

With these results, it can be confirmed that both molecules are incorporated into the bilayer by inserting between the acyl chains of the phospholipids. Probably, along the chain there is more than one molecule of the additive.

3.3. Encapsulation of Resazurin

The assembly characteristics of the liposomes allow simultaneous entrapment of molecules with different polarities. In this research, resazurin was chosen as a hydrophilic model molecule to be encapsulated in DSPC liposomes doped with pinoembrin.

Fig. 12 shows the DSC trace of the systems containing resazurin. In this case, the thermal profile of the main transition temperature is little affected when the hydrophilic molecule is incorporated; however, the endotherm of the pre-transition disappears and the enthalpy of the main transition increases. Also, the entropy increases in liposomal formulations with resazurin (Fig. 10). With these observations, it is confirmed that resazurin is unable to be incorporated between the acyl chains of the liposome, but it can interact with the polar heads of the phospholipids, as already observed in the literature with dequalinium chloride with phosphatidylcholine bilayers [40].

When the liposomal formulation contains pinoembrin and resazurin, the pre-transition disappears and the T_m decreases, demonstrating that both molecules are entrapped in the liposome. On the one hand, resazurin is housed in the aqueous center of the liposome and can form electrostatic interactions with the polar head of the phospholipid. On the other hand, pinoembrin is placed between the lipid chains of the bilayer.

3.4. Stability

To determine the flocculation time of the different liposomal formulations and predict their tendency to aggregate, the particle sizes of the systems were measured from the day of preparation until the appearance of a visible precipitate. Fig. 13 shows the size of the liposomes as a function of time.

The empty liposome has a size around 100 nm that remains

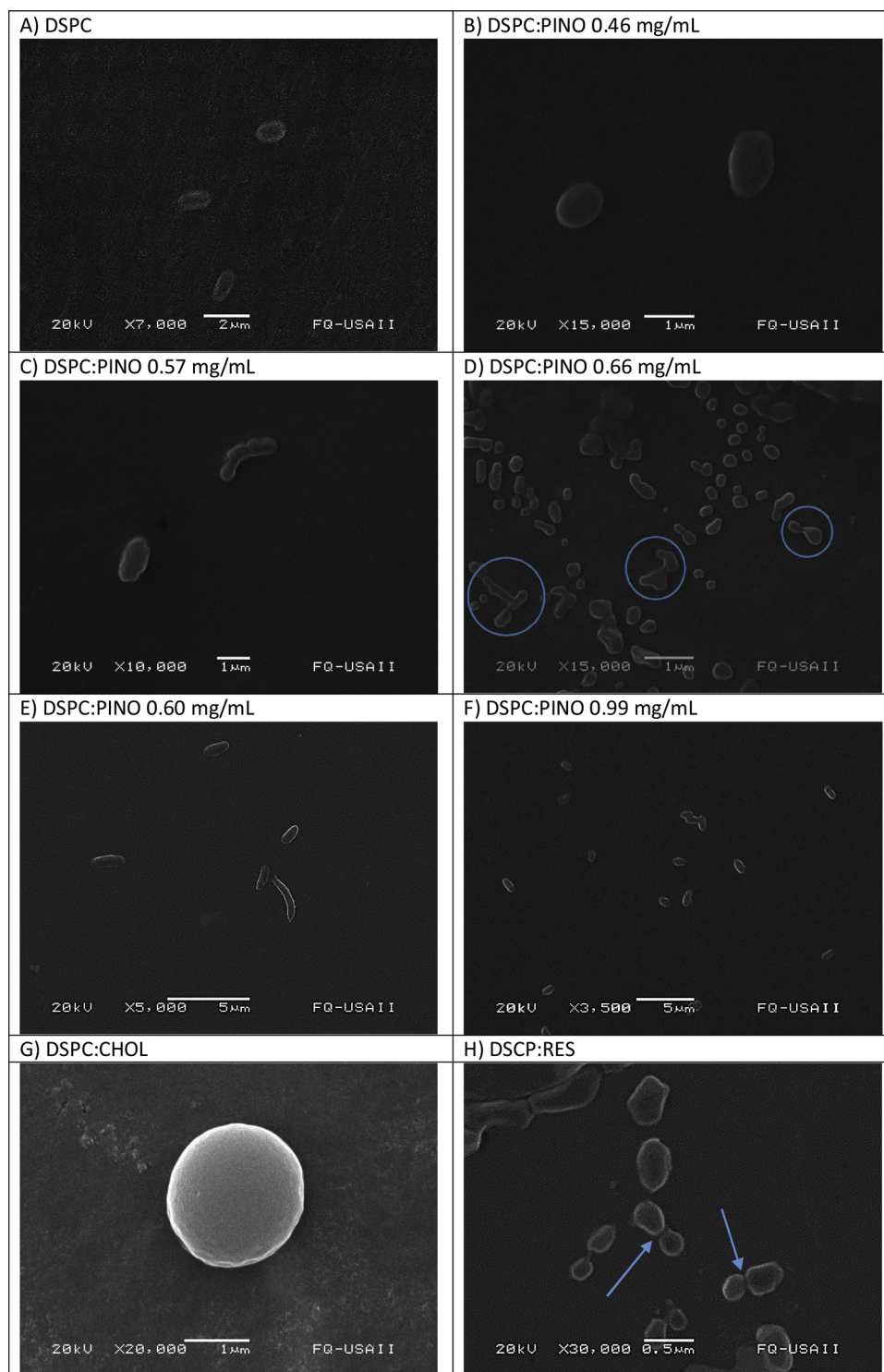


Fig. 14. Morphology of DSPC systems. A) DSPC; B) DSPC/Pinocembrin 0.46 mg/mL; C) DSPC/Pinocembrin 0.57; D) DSPC/Pinocembrin 0.66 mg/mL, circles enclose fused vesicles; D) C) DSPC/Pinocembrin 0.99 mg/mL; E) DSPC/Cholesterol; F) DSPC/Resazurin, arrows point to joined vesicles.

practically constant through the days and can remain in suspension for more than 30 days.

A slight change in size is observed when cholesterol is added, which may be due to the space occupied by this molecule when it is inserted in the membrane; the size of this system remains stable up to 18 days. Some studies have reported that cholesterol is able to change the permeability of water in the liposome [34]. The destabilization of vesicles in the air/water interphase has been used as a tool to study the behavior of the membrane; if there is no permeability, there is no deformation of

the liposome surface, consequently, the liposome keeps its shape and size for a longer time and will not tend to be aggregated [13]. However, an excess of additive could lead to membrane saturation and decreases liposomal stability.

DSPC:PINO (4:1) system is stable for 21 days. In this case, the size of the liposomes increases as a function of time, probably the liposomes fuse together forming new colloidal structures of greater size; in other words, the membrane is rearranged by relocating individual lipid molecules between layers of adjacent lipids [39].

The system containing resazurin (DSPC:RES 4:1) has a larger size, close to 400 nm. If this molecule is inserted between the polar heads of the phospholipids, it can cause a considerable increase in the diameter of the liposome, especially if it is in the inner monolayer of the vesicle.

The system that tends to flocculate fastest is the one that contains DSPC:CHOL:PINO (4:1:1), day 12 after its preparation, this could happen because the formation of small liposomes requires a large amount of energy and when incorporating two hydrophobic molecules, a thermodynamically unfavorable packing is created. Flocculation is a mechanism to dissipate excess surface energy that is caused by the distorted molecular bundling. This result implies that the steric hindrance caused by the presence of two hydrophobic molecules in the lipid bilayer plays an important role in the stability of the liposomes in suspension. In this system, the liposomes do not change considerably in size, which suggests that there is no fusion between them.

DSPC:PINO:RES (4:1:1) liposomal suspension precipitated at day 15, without a significant change in the size of the vesicle. In this suspension, the formation of golden solid particles was observed, which were attributed to the precipitation of pinocembrin. This suggests some type of interaction between pinocembrin and resazurin that could alter the solubility of the molecules and, therefore, the release profile. Precipitation in liposomes has been observed in other studies that incorporate hydrophilic molecules, as a result, amorphous particles or nanocrystals are formed [41].

3.5. Entrapment efficiency

With the different concentrations of pinocembrin studied, as described in section 2.4, the incorporation efficiency was 99 %, this result is because pinocembrin is highly hydrophobic, practically insoluble in water and can only be incorporated into the bilayer. It is important to note that although literature reports that the incorporation of large amounts of lipophilic compounds in the bilayer of the liposome can lead to low entrapment efficiencies in the final product [42], this does not happen in the DSPC liposomes with pinocembrin, probably because the length of the phospholipid chains allows an efficient arrangement and a higher capture percentage; furthermore, the domain formation helps to incorporate more additive. The presence of another molecule, such as resazurin or cholesterol, does not interfere with the incorporation efficiency of pinocembrin.

When determining the encapsulation efficiency of resazurin, it was found that only about 50 % of the initial amount added is found in the nucleus. Since the prepared liposomes are SUVs, it is possible that the space of the aqueous center limits the possibility of encapsulation of the molecule and because of the high hydrophilicity of this molecule, a large part remains in the solution.

3.6. Morphology

The micrographs obtained by SEM are presented in the Fig. 14. If the morphology of the produced liposomes is compared, it is observed that almost all the liposomes have an ovoid or tubular morphology with some deformation.

With these images, it can be confirmed that the DSPC:PINO vesicles are fused to form larger structures (Fig. 14D). With a higher amount of pinocembrin, the liposomes are elongated (Fig. 14C–E), as we observed in previous studies with dimiristoylphosphatidylcholine liposomes [33], where it was demonstrated that the appearance of two signs in the calorimetric trace is due to spherical and tubular structures with different physicochemical properties. Cholesterol, in combination with pinocembrin, prevents deformation of the liposome surface, a totally spherical structure is observed (Fig. 14G). Fig. 14H shows the system containing resazurin, the interaction between neighboring liposomes (marked by arrows) is observed, indicating that the vesicles stick (“kissing liposomes” [36]) so that the phenomenon of flocculation could be favored; in addition, the appearance of larger populations in

the measurements made by DLS agrees with this finding.

3.7. Conclusions

It is possible to incorporate molecules of different polarity in the same formulation of DSPC liposomes with a high entrapment efficiency. Both pinocembrin and cholesterol (hydrophobic molecules) have a fluidization effect on the membrane, the greater the amount of these additives, the greater the modification of the thermotropic behavior of the liposome. The appearance of more than one peak in the calorimetric trace is consistent with the explanation that the bilayer doped with a guest molecule may consist of a range of phases that differ slightly in their packing characteristics. The results obtained suggest that the pinocembrin has a tendency to be added in regions where other molecules have previously been hosted, this result may be due to a decrease in the packing and entropy of the membrane that favors the incorporation of other guests; in addition, because of the length of the hydrophobic region of the phospholipid, it could incorporate more than one pinocembrin molecule along the chain. On the other hand, resazurin (hydrophilic molecule) slightly modifies the profile of the pre-transition phase because of its encapsulation in the aqueous center of the vesicle and the interaction with the polar heads of the phospholipid. The presence of cholesterol does not modify the incorporation efficiency of pinocembrin and helps a better distribution of this molecule in the membrane, however, it decreases the stability in an aqueous medium. This research can provide useful information in order to formulate a drug delivery system made with liposomal suspensions that have a high potential to be used for the treatment of cancer and other diseases.

Acknowledgments

The present work was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT, grant 270969) and Facultad de Química (PAIP 5000-9020). We are grateful to Dra. Josefa Bernad Bernad and Dr. Ismael Bustos Jaimés for their support with Nanosizer equipment, Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo, Q.F.B. Teresa Ballado Nava and Dr. Georges Dreyfus for allowing us to use the extruder, Dr. Rafael Ivan Puente Lee from Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI, UNAM) for his assistance in obtaining microscopies.

References

- [1] M. Oroian, S. Ropciuc, Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds, *Comput. Electron. Agric.* 138 (2017) 148–156, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.04.020>.
- [2] H. Hanieh, V.I. Hairul Islam, S. Saravanan, M. Chellappandian, K. Ragul, A. Durga, K. Venugopal, V. Senthilkumar, P. Senthilkumar, K. Thirugnanasambantham, Pinocembrin, a novel histidine decarboxylase inhibitor with anti-allergic potential in vitro, *Eur. J. Pharmacol.* 814 (2017) 178–186, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.012>.
- [3] L. Estevinho, A.P. Pereira, L. Moreira, L.G. Dias, E. Pereira, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3774–3779, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.062>.
- [4] P. Tuchinda, V. Reutrakul, P. Claeson, U. Pongprayoon, T. Sematong, T. Santisuk, W.C. Taylor, Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*, *Phytochemistry*. (2002), [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00451-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00451-4).
- [5] J.B. Žižić, N.L. Vuković, M.B. Jadrnanin, B.D. Anđelković, V.V. Tešević, M.M. Kacanić, S.B. Sukdolak, S.D. Marković, Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line, *J. Sci. Food Agric.* 93 (2013) 3001–3009, <https://doi.org/10.1002/jsfa.6132>.
- [6] J. Han, D.G. Cox, G. a Colditz, D.J. Hunter, The p53 codon 72 polymorphism, sunburns, and risk of skin cancer in US Caucasian women, *Mol. Carcinog.* 45 (2006) 694–700, <https://doi.org/10.1002/mc>.
- [7] C.L. Hsu, Y.S. Yu, G.C. Yen, Anticancer effects of *Alpinia pricei* Hayata roots, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2201–2208, <https://doi.org/10.1021/jf9038056>.
- [8] S. Ahmed, N.H. Othman, Honey as a potential natural anticancer agent: a review of its mechanisms, Evidence-based complement, *Altern. Med.* 2013 (2013), <https://doi.org/10.1155/2013/829070>.
- [9] P. Zrimšek, J. Kunc, M. Kosec, J. Mrkun, Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality, *Int. J. Androl.* 27 (2004)

- 57–62, <https://doi.org/10.1046/j.0105-6263.2003.00448.x>.
- [10] V. Kuete, A.T. Mbateng, M. Zeino, C.D. Fozing, B. Ngameni, G.D.W.F. Kapche, B.T. Ngadjui, T. Efferth, Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells, *Phytomedicine*. 22 (2015) 1096–1102, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.006>.
- [11] M. Goniotiaki, S. Hatziantoniou, K. Dimas, M. Wagner, C. Demetzos, Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 1217–1224, <https://doi.org/10.1211/0022357044382>.
- [12] T.L.N. Ju Yuan, J. Liu, Y.L. Hu, Y. Fan, D. Wang, L. Guo, Y.W. Xiaojuan Zhao, X. Liu, C. Liu, The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against ND vaccine, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 400–405.
- [13] J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, Y. Deng, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian J. Pharm. Sci.* 10 (2014), <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.
- [14] U. Bhardwaj, D.J. Burgess, Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone, *Int. J. Pharm.* 388 (2010), <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.003>.
- [15] M.L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Deliv. Transl. Res.* 5 (2015) 231–242, <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.
- [16] T. Lu, T.L.M. Ten Hagen, Inhomogeneous crystal grain formation in DPPC-DSPC based thermosensitive liposomes determines content release kinetics, *J Control Release*. (2017), <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.030>.
- [17] A. Aygun, K. Torrey, A. Kumar, L.D. Stephenson, Investigation of factors affecting controlled release from photosensitive DMPC and DSPC liposomes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2012), <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9724-6>.
- [18] Y.P. Patil, S. Jadhav, Novel methods for liposome preparation, *Chem. Phys. Lipids* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>.
- [19] G. Neunert, J. Tomaszewska-Gras, P. Siejak, Z. Pietralik, M. Kozak, K. Polewski, Disruptive effect of tocopherol oxalate on DPPC liposome structure: DSC, SAXS, and fluorescence anisotropy studies, *Chem. Phys. Lipids* 216 (2018) 104–113, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.10.001>.
- [20] M. Di Foggia, S. Bonora, A. Tinti, V. Tugnoli, DSC and Raman study of DMPC liposomes in presence of Ibuprofen at different pH, *J. Therm. Anal. Calorim.* 127 (2017) 1407–1417, <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5408-8>.
- [21] C. Demetzos, Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability, *J. Liposome Res.* 18 (2008) 159–173, <https://doi.org/10.1080/08982100802310261>.
- [22] G.M.M. El Maghraby, A.C. Williams, B.W. Barry, Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas, *Int. J. Pharm.* 292 (2005) 179–185, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.037>.
- [23] S. Kaneshina, H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, Barotropic phase transitions of dioleoylphosphatidylcholine and stearyl-oleoylphosphatidylcholine bilayer membranes, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1374 (1998) 1–8, [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00122-9).
- [24] S.M. Ohline, M.L. Campbell, M.T. Turnbull, S.J. Kohler, Differential scanning calorimetric study of bilayer membrane phase transitions. A biophysical chemistry experiment, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 1251, <https://doi.org/10.1021/ed078p1251>.
- [25] D. Augustyńska, K. Burda, M. Jemioła-Rzemieńska, K. Strzałka, Temperature-dependent bifurcation of cooperative interactions in pure and enriched in β -carotene DPPC liposomes, *Chem. Biol. Interact.* 256 (2016) 236–248, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.015>.
- [26] M. Sala, F. Locher, M. Bonvallet, G. Agusti, A. Elaissari, H. Fessi, Diclofenac loaded lipid nanovesicles prepared by double solvent displacement for skin drug delivery, *Pharm. Res.* 34 (2017) 1908–1924, <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2201-8>.
- [27] N.V.N. Jyothi, P.M. Prasanna, S.N. Sakarkar, K.S. Prabha, P.S. Ramaiah, G.Y. Srawan, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, *J. Microencapsul.* 27 (2010) 187–197, <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>.
- [28] B. Kneidl, M. Peller, G. Winter, L.H. Lindner, M. Hossann, Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review, *Int. J. Nanomedicine* (2014), <https://doi.org/10.2147/IJN.S49297>.
- [29] B.R. Lentz, Y. Barenholz, E. Thompson, Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. I. Single component phosphatidylcholine liposomes, *Biochemistry*. 15 (1976) 4521–4528.
- [30] M.K. Jain, N.M. Wu, Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer, *J. Membr. Biol.* 34 (1977) 157–201, <https://doi.org/10.1007/BF01870299>.
- [31] P. Garidel, C. Johann, A. Blume, Thermodynamics of lipid organization and domain formation in phospholipid bilayers, *J. Liposome Res.* 10 (2000) 131–158, <https://doi.org/10.3109/08982100009029383>.
- [32] W.K. Subczynski, A. Wisniewska, W.K. Subczynski, A. Wisniewska, J.J. Yin, J.S. Hyde, A. Kusumi, Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol, *Biochemistry*. 33 (1994) 7670–7681, <https://doi.org/10.1021/bi00190a022>.
- [33] E. Uria-Canseco, S. Perez-Casas, Spherical and tubular dimyristoylphosphatidylcholine liposomes, *J. Therm. Anal. Calorim.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08416-0>.
- [34] H. Pruchnik, Influence of cytotoxic butylin complexes with 2-sulfobenzoic acid on the thermotropic phase behavior of lipid model membranes, *J. Therm. Anal. Calorim.* 127 (2017) 507–514, <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5489-4>.
- [35] J.S. Harris, D.E. Epps, S.R. Davio, F.J. Kézdy, Evidence for Transbilayer, Tail-to-Tail Cholesterol Dimers in Dipalmitoylglycerophosphocholine Liposomes, *Biochemistry*. 34 (1995) 3851–3857, <https://doi.org/10.1021/bi00011a043>.
- [36] X. Wei, Y. Patil, P. Ohana, Y. Amitay, H. Shmeeda, A. Gabizon, Y. Barenholz, Characterization of Pegylated Liposomal Mitomycin C Lipid-Based Prodrug (Promitil) by high sensitivity differential scanning calorimetry and cryogenic transmission electron microscopy, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 4339–4345, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00865>.
- [37] X.-C. Li, D. Ferreira, Y. Ding, Determination of absolute configuration of natural products: theoretical calculation of electronic circular dichroism as a tool, *Curr. Org. Chem.* 14 (2010) 1678–1697, <https://doi.org/10.2174/13857210792927717>.
- [38] K.M.G. Taylor, R.M. Morris, Thermal analysis of phase transition in liposomes behaviour, *Thermochim. Acta* 248 (1995) 289–301, [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01884-J](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01884-J).
- [39] L. Zhao, S.S. Feng, N. Kocherginsky, I. Kostetski, DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 258–266, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.045>.
- [40] F. Sauvage, F.X. Legrand, M. Roux, I. Rajkovic, T.M. Weiss, Z. Varga, L. Augis, G. Nuge, J.C. Debouzy, J. Vergnaud-Gauduchon, G. Barratt, Interaction of dequalinium chloride with phosphatidylcholine bilayers: A biophysical study with consequences on the development of lipid-based mitochondrial nanomedicines, *J. Colloid Interface Sci.* 537 (2019) 704–715, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.059>.
- [41] T. Li, D. Cipolla, T. Rades, B.J. Boyd, Drug nanocrystallisation within liposomes, *J. Control. Release* 288 (2018) 96–110, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.001>.
- [42] J. Oliveira Eloy, M. Claro De Souza, R. Petrilli, J. Palma, A. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 123 (2014) 345–363, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>.



Thermodynamic characterization of the inclusion complexes formation between antidiabetic new drugs and cyclodextrins



Elizabeth Uria-Canseco^a, Silvia Perez-Casas^{a,*}, Gabriel Navarrete-Vázquez^b

^a Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^b Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2018

Received in revised form 8 August 2018

Accepted 17 September 2018

Available online 19 September 2018

Keywords:

Cyclodextrins

Diabetes

Cyclodextrin non-steroidal drug complex

ITC

Benzothiazole

Benzesulfonamide

ABSTRACT

Inclusion complexes were formed using β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin to encapsulate a series of new non-steroidal drugs with antidiabetic properties presenting low water solubility. Complexes were thermodynamically characterized through Isothermal Titration Calorimetry (ITC). The 298 K complexation process turned out to be spontaneous in all cases, mainly because it was guided by entropy. It was found that the two main functional groups forming the studied drugs were able to interact with the cyclodextrin cavity, data suggest a 1:1 stoichiometry. Steric hindrance and host desolvation play a fundamental role in the drug's cyclodextrin cavity incorporation. This study increases treatment possibilities for type 2 diabetes mellitus using FDA-approved biocompatible drug delivery systems, thus increasing solubility and application possibilities of the encapsulated active substance.

© 2018 Elsevier Ltd.

1. Introduction

It has been estimated that in the year 2000 there were 171 million people in the world with diabetes and this is projected to increase to 366 million by 2030 [1]. Glucocorticoids (GCs) are potent functional antagonists of insulin action that promote gluconeogenesis in the liver, potentially leading to increased blood glucose concentrations in diabetes [2]. At tissue level, the access of active GCs to its receptor is governed by 11 β hydroxy-steroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1). This enzyme, which is mainly expressed in liver and adipose tissue, catalyses the conversion of inactive cortisone into the active hormone cortisol. Several lines of evidence have implicated GCs and 11 β HSD1 activity in the etiology and/or maintenance of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) and metabolic syndrome. Navarrete-Vázquez et al. [3] have been working on the synthesis of arylsulfonamido (benzo)thiazoles (ABTs) as a starting point to design the non-steroidal class of 11 β HSD1 inhibitor compounds shown in Table 2. After preparing a new drug, the next step is to prepare it in a way that it is possible to deliver the required amount of drug to the targeted site for a required period of time, both efficiently and precisely [4]. Low solubility of ABTs could reduce their potential application in pharmaceutical formulations. Cyclodextrins (CDs) are cyclic

oligosaccharides composed of glucose units with a broad range of pharmaceutical applications. The cavity of a CD is nonpolar, whereas its outer surface is hydrophilic. CDs work in pharmaceutical applications by incorporating a hydrophobic drug molecule or incorporating the hydrophobic part of a drug into its nonpolar cavity. Furthermore, when CDs interact with adequately-sized molecules, they can form inclusion complexes which have been found to improve the solubility, stability, dissolution rate, and bioavailability of target compounds [5]. Recently, CDs have been studied as potential insulin and insulin analogue delivery systems, because they have not shown adverse side effects in diabetes treatment [6–12]. In this work we determined the thermodynamic parameters for complex formation between some selected 11 β HSD1 inhibitors and cyclodextrins.

2. Experimental

2.1. Materials

Navarrete-Vázquez *et al.* synthesized all the arylsulfonamido (benzo)thiazoles studied here, as reported in reference 3; the nomenclature was maintained. Cyclodextrins and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Aldrich. These materials were of the highest purity available and were used without further purification (Table 1). The properties and molecular structures of the ABTs and chemicals used in this study are depicted in Tables 1 and 2.

* Corresponding author.

E-mail address: silpeca@unam.mx (S. Perez-Casas).

Table 1
Notation, sources and purities of the chemicals used in this study.

Notation	Chemical Name	Source	Purification Method	Mole Fraction Purity	Analysis Method
C13	N-(6-Ethoxy-1,3-benzothiazol-2-yl) benzenesulfonamide	synthesis	Recrystallization	0.999	Thermal analysis
C14	N-(6-Ethoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)-4-methylbenzenesulfonamide	synthesis	Recrystallization	0.993	Thermal analysis
C15	N-(6-Ethoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide	synthesis	Recrystallization	0.997	Thermal analysis
C19	4-Methoxy-N-(6-nitro-1,3-benzothiazol-2-yl) benzenesulfonamide	synthesis	Recrystallization	0.99	Elemental Analysis
C20	4-Methyl-N-(6-nitro-1,3-benzothiazol-2-yl) benzenesulfonamide	synthesis	Recrystallization	0.99	Elemental Analysis
C21	4-Methoxy-N-(6-nitro-1,3-benzothiazol-2-yl) benzenesulfonamide	synthesis	Recrystallization	0.99	Elemental Analysis
DMSO	Dimethylsulfoxide	Sigma-Aldrich	none	0.995 ^a	–
β-CD	β-cyclodextrin	Sigma-Aldrich	none	0.98 ^a	–
HP-β-CD	(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin	Sigma	none	–	–

^a As stated by suppliers.

Table 2
Molecular structures and properties of the arylsulfonamido (benzo)thiazoles used in this work. Data from reference 3.

Notation	Structure	Molar Mass/(g·mol ⁻¹)	Melting Point/(°C) ^a
C13		334	270.0–271.0
C14		348	228.4–230.3
C15		364 ^a	220.3–222.2
C19		335	241.5–248.9
C20		349	178.1–179.6
C21		365	187.1–189.3

^a Datum corrected from original paper, reference 3.

Solutions were prepared by weight (Mettler AT250, with an accuracy of ± 0.0002 g) using distilled and deionized water (Barnstead Nanopure Infinity, with a resistivity of 18 M Ω -cm) taking into account the hydration of the CD. The water content (weight per cent) of the samples was determined by the Karl-Fisher method (701 KF Titrino, Metrohm, Swiss) using Hydranal Composite 5 reagent from Sigma-Aldrich and obtaining the following values: β -cyclodextrin (8.6 ± 0.31) H₂O denoted by β -CD; hydroxypropyl- β -cyclodextrin (4.49 ± 0.21) H₂O (MS = 1.19, MW = 1540 g·mol⁻¹) denoted by HP- β -CD-MS. MS denotes molecular substitution and it refers to the number of OH groups substituted in one glucopyranose unit. In every case the MS was estimated by Aldrich.

2.2. Apparatus and procedure

All the experiments were performed at atmospheric pressure at (777.1 \pm 0.5) hPa and at $T = (298.118 \pm 0.004)$ K. The calorimetric measurements were carried out by means of a thermal activity monitor (TAM) (Thermometric, Sweden) equipped with a 2201-high performance ampoule calorimeter unit with a 4 mL micro reaction system and a Lund syringe pump with control box. Prior to the start and at the end of each experiment, an electric calibration of the calorimetric unit was carried out in order to adjust the power sensor in the cells. This calorimeter uses the differential

configuration in which one of the cells acts as a reference and the other as a reaction cell [13]. Of the series of drugs with antidiabetic properties synthesized by Navarrete-Vázquez *et al.*, none presented minimum solubility in pure water in order to get a solution with a concentration of at least 2.5 mM; with this concentration, a measurable calorimetric answer is guaranteed and, therefore, solutions of cyclodextrin and drugs were prepared using a standard solution of DMSO–water 80% w/w; the concentration of ABTs ranged between 2.88 and 4.50 mmol kg⁻¹, cyclodextrin concentrations were at least seven times greater than that of the drug. In the experiments, 30 to 50 titrations with an addition volume of (50 or 30) μ L of CD were performed, to inject a total volume of 1500 μ L. The injectors as well as the collection of titration data were controlled by a computer. The sample cell contained approximately 2 mL of the studied ABT and the reference has the same amount of DMSO–water solution. In order to determine ABT's dilution heat, an experiment was carried out separately. The CDs' dilution heat in this type of experiments is negligible [14]; in addition, in some studies it is concluded that DMSO does not form inclusion complexes with CDs [15]. Therefore, in this study, only the encapsulation of antidiabetic drugs is considered.

Of the commercially available cyclodextrins, β -CD was chosen to test ABT encapsulation, because it has an intermediate cavity size, (0.6–0.65) nm, it has proven efficient drug complexation, minimal side effects, and low cost. Furthermore, very little absorption

(1–2%) and almost no metabolism in the upper intestinal tract after oral administration makes it probably the most studied CD in humans, [16,17] as a pharmaceutical formulation, even though it has the least solubility from native cyclodextrins and, therefore, HP- β -CD, whose water solubility is much greater than native cyclodextrin's, was tested as well.

2.3. Mathematical model

Experimental data were treated with the mathematical model reported by Eftink and Biltonen [18], as described in detail in previous works [14,19] using Digitam 4.1 software from Thermometric to calculate the equilibrium constants and enthalpies for the complex formation. An example of the fitting is given below.

The process for 1:1 complex formation can be denoted as follows:



where F corresponds to the Drug, F-CD denotes the complex formed by the inclusion of F into CD, and CD to the employed cyclodextrin. The equilibrium constant of reaction is:

$$K = \frac{[F - CD]}{[F][CD]} \quad (2)$$

The enthalpy of formation of the complex, ΔH^* , that can be expressed as a function of the actual molality of the guest molecule, m_F , of the standard molar enthalpy of association, ΔH° , and the equilibrium constant, K, as follows in a linear form:

$$\frac{m_{CD}}{\Delta H^*} = \frac{1}{\Delta H^\circ} + \frac{1}{\Delta H^\circ K m_F} \quad (3)$$

Once ΔH and equilibrium constant (K) values were obtained, the Gibbs energy, ΔG° , and the change of entropy, $T\Delta S^\circ$, for the inclusion process were calculated from Eqs. (4) and (5).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S \quad (4)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (5)$$

3. Results and discussion

Adjusting the mathematical model to the experimental data suggests a 1:1 stoichiometry. In the case of the C14 drug with β -CD, the results seem to show the formation of the F-CD₂ complex as well; but, it was not possible to confirm it given the adjustment's uncertainty (data are not displayed).

Table 3 shows the thermodynamic parameters obtained from the formation of inclusion complexes between ABTs and β -CD; whereas in Table 4, the ones from complex formation with HP- β -CD are presented.

Gibbs free energy has two contributions, an enthalpic and an entropic one; in a spontaneous reaction, at constant pressure and temperature, ΔG must have a negative value. This process is favoured by an exothermic reaction and a positive $T\Delta S$ value. Gibbs Energy negative values shown in Tables 3 and 4 mean that the encapsulation process of ABTs with β -CD and HP- β -CD is spontaneous. The only complex with negative enthalpy values is C13 with β -CD. In this case, entropy change is very close to zero, so the complexation reaction follows enthalpy, because it is an exothermic process. For the rest of the complexes, enthalpy values are positive; therefore, it can be asserted that the thermodynamic reaction is guided by entropy.

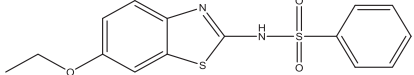
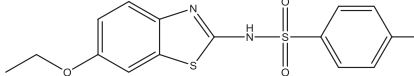
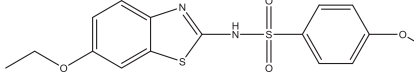
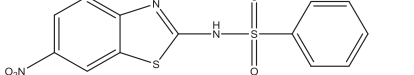
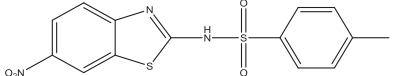
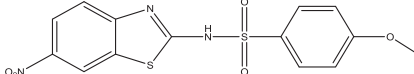
The most important contributions in the formation of F-CD complexes are due to: (1) hydrophobic effect, which consists in the desolvation of the host molecule, the penetration of ABT's hydrophobic part inside the cyclodextrin cavity, water molecule movement from inside the CD into the bulk; [20,21] (2) the formation and rupture of hydrogen bond, electrostatic interactions, from Van Der Waals and hydrophobic; (3) steric hindrance; and (4) cyclodextrin stabilization by the host molecule [22].

The structure analysis of the molecules allows explaining the dependency of the obtained thermodynamic parameter values with the above mentioned contributions.

For study purposes, classifying ABTs is possible according to their prevailing functional groups: benzothiazole (a) and benzenesulfonamide (b) (Fig. 1). Considering the functional groups that are

Table 3

Thermodynamic parameters equilibrium constant (K), Enthalpy change (ΔH°), Entropy change ($T\Delta S^\circ$) and Gibbs free energy change (ΔG°) of the inclusion complex formation between arylsulfonamido (benzo)thiazoles (ABT) and β -cyclodextrin at atmospheric pressure $p = (777.1)$ hPa and temperature $T = (298.118)$ K. Solutions of cyclodextrin and drugs were prepared using a standard solution of dimethyl sulfoxide (DMSO) 80.03% in water(w/w).^a

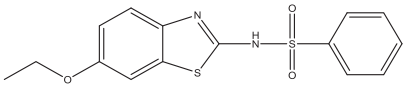
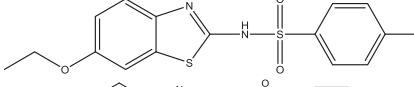
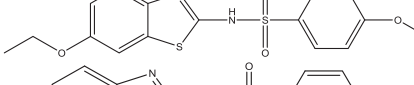
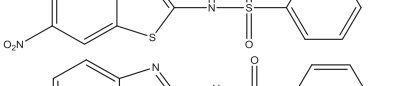
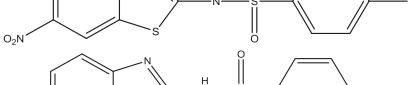
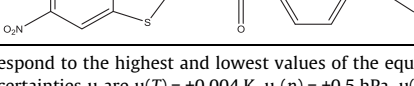
ABT	Structure	$K/(\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta H^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$T\Delta S^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
C13		53 ± 4^b	-10.4 ± 0.5	-9.9 ± 0.2	-0.6 ± 0.3
C14		66 ± 5	20.3 ± 0.9	-10.4 ± 0.2	30.7 ± 0.8
C15		130 ± 10	4.6 ± 0.2	-12.1 ± 0.2	16.6 ± 0.00
C19		19 ± 1	27.2 ± 1.6	-7.3 ± 0.2	34.5 ± 1.4
C20		15 ± 1	36.7 ± 3.0	-6.7 ± 0.2	43.4 ± 2.8
C21		50 ± 3	17.3 ± 0.7	-9.7 ± 0.1	26.9 ± 0.5

Bold values correspond to the highest and lowest values of the equilibrium constant of the studied complexes.

^a Standard uncertainties u are $u(T) = \pm 0.004$ K, $u(p) = \pm 0.5$ hPa, $u(\% \text{DMSO}) = \pm 0.01\%$.

^b The reported uncertainties are standard uncertainties.

Table 4
Thermodynamic parameters equilibrium constant (K), Enthalpy change (ΔH°), Entropy change ($T\Delta S^\circ$) and Gibbs free energy change (ΔG°) of the inclusion complex formation between arylsulfonamido (benzo)thiazoles (ABT) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin at atmospheric pressure $p = (777.10)$ hPa and temperatura $T = (298.118)$ K. Solutions of cyclodextrin and drugs were prepared using a standard aqueous solution of dimethyl sulfoxide (DMSO) 80.03% (w/w).^a

ABT	Structure	$K/(\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta H^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$T\Delta S^\circ/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
C13		62 ± 4^b	3.7 ± 0.2	-10.2 ± 0.2	13.9 ± 0.2
C14		13 ± 1	29.4 ± 2.5	-6.4 ± 0.2	35.9 ± 2.3
C15		29 ± 3	12.7 ± 0.9	-8.4 ± 0.2	21.1 ± 0.7
C19		31 ± 2	18.8 ± 0.8	-8.5 ± 0.1	27.3 ± 0.7
C20		21 ± 1	15.7 ± 0.7	-7.5 ± 0.1	23.2 ± 0.6
C21		174 ± 17	6.3 ± 0.3	-12.8 ± 0.2	19.1 ± 0.1

Bold values correspond to the highest and lowest values of the equilibrium constant of the studied complexes.

^a Standard uncertainties u are $u(T) = \pm 0.004$ K, $u(p) = \pm 0.5$ hPa, $u(\% \text{DMSO}) = \pm 0.01\%$.

^b The reported uncertainties are standard uncertainties.

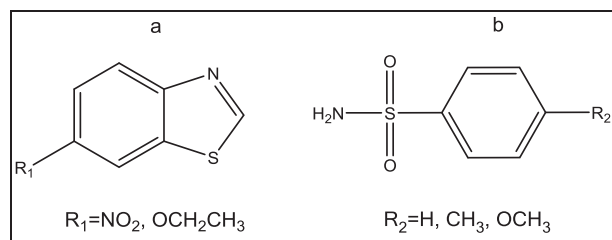


Fig. 1. Main functional groups that compose ABTs.

placed in position R_1 , we can classify ABTs as nitrated and ethoxylated compounds.

Various investigations have reported complexation between β -CD with sulfonamide derivatives and phenylthiazole derivatives [23–26]. M. Warners suggests that the phenyl group as well as benzothiazole can penetrate the cyclodextrin cavity [24], so it is feasible to assume that ABT encapsulation can occur on both sides of the molecule and that 1:2 complex formation is probable. However, this study proved that only 1:1 stoichiometry is favored in the same compound family without determining which functional group preferentially penetrates the cyclodextrin cavity.

Some studies have proven a particular tendency of the molecules containing sulfur to penetrate the hydrophobic cavity [25,26] Since the length of the benzothiazole group is greater than that of the phenyl group in benzenesulfonamide, and both are hydrophobic, the inclusion complex would seem to form preferably among the benzothiazole group and cyclodextrin; nevertheless, when R_1 substituent is kept steady while R_2 substituent is modified, the thermodynamic parameters change and indicate the probable penetration of benzenesulfonamide's phenyl group.

In Fig. 2, enthalpy and entropy values of ethoxylated molecules (C13, C14, and C15) are displayed, in which R_2 substituents, encapsulated in β -CD and HP- β -CD, change. In these complexes, if one hydrogen is exchanged for a methyl group or a methoxyl, enthalpy increases; this is the expected result, considering that, in the bulkier substituents, the solvation sphere is greater and more energy

will be required to achieve drug desolvation to form the complex, i.e. the participation of the hydrophobic effect is important in the encapsulation process with increased enthalpy. Nevertheless, this increase is minor when the proton is substituted by an OCH_3 ; this functional group could block one of the CD's rim, increasing the value of the equilibrium constant, as observed in the results for native cyclodextrin (Table 3); this phenomenon is known as “capping effect”. HP- β -CD-ABT interactions are weaker due to steric hindrance, whereas hydrogen and methyl can deeply penetrate the cyclodextrin cavity and bring on more hydrophobic interactions; the methoxyl volume may interfere in the encapsulation process.

If we consider the entropy values, we can observe the same behaviour: when the substituent volume increases, entropy increases and the maximum value with the methyl group is obtained, which suggests that this functional group is the most appropriate for the cyclodextrin cavity size, moving a greater number of water molecules to the bulk and forming a stable complex. With this result, we confirm that the C15 drug anchors itself to the cyclodextrin cavity through the methoxyl group in benzenesulfonamide, thus preventing complete dehydration of the cavity.

Fig. 3 shows in graphic format the thermodynamic parameters of the C19, C20, and C21 complex formation with native and modified cyclodextrin. These molecules are nitrated in position R_1 and position R_2 is occupied by a hydrogen, methyl or methoxyl.

Nitrated molecules display different behaviour than that presented by ethoxylated molecules. The encapsulation of aminonitrobenzothiazole in β -CD studied by Swaminathan [27] reveals the presence of the nitro group inside the cavity. The structural similarity with encapsulated ABTs in this research leads us to believe that, in this case, it is benzothiazole that forms the complex; moreover, the formation of intermolecular hydrogen bonds is possible.

On one hand, with native cyclodextrin, when the proton is exchanged for methyl, the complexation reaction is more endothermic, i.e. interactions between the solvent with the host and CD are stronger. However, when hydrogen changes to methoxyl, enthalpy decreases; in this case, because the results

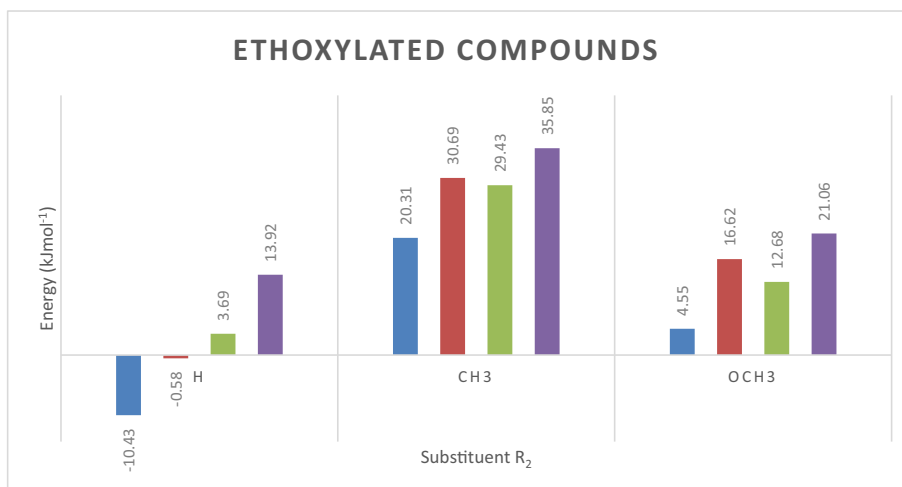


Fig. 2. Thermodynamic parameters ΔH° and $T\Delta S^\circ$ of ethoxylated molecules with β -CD and HP- β -CD. $R_2 = H, CH_3, OCH_3$. ΔH° β -CD (blue), $T\Delta S^\circ$ β -CD (red), ΔH° HP- β -CD (green), $T\Delta S^\circ$ HP- β -CD (purple).

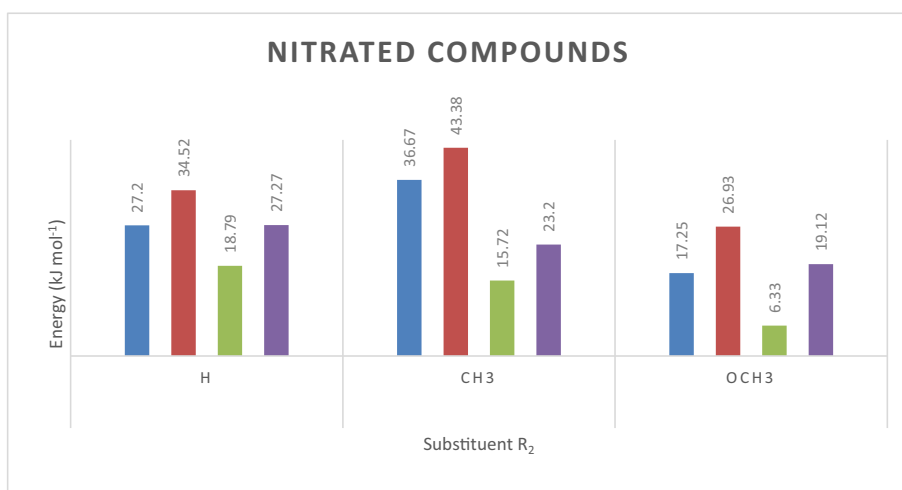


Fig. 3. Thermodynamic parameters ΔH° and $T\Delta S^\circ$ of nitrated molecules with β -CD and HP- β -CD. $R_2 = H, CH_3, OCH_3$. ΔH° β -CD (blue), $T\Delta S^\circ$ β -CD (red), ΔH° HP- β -CD (green), $T\Delta S^\circ$ HP- β -CD (purple).

are different from the ethoxylated molecules, we can assume that, besides benzenesulfonamide, benzothiazole interacts with the cavity as well.

If we observe the entropy values, it decreases as substituents become bulkier, which means that they move a lesser amount of water molecules to the bulk. Also, the presence of a polar substituent, such as the nitro group, could decrease complexation hydrophobicity, resulting in entropy decrease [28]. On the other hand, with the modified cyclodextrin, the contribution of steric hindrance to thermodynamic parameters is more evident and therefore the C21-HP- β -CD complex has the least ΔH and the least entropy.

Molecules forming more stable complexes are C15 with β -CD, and C21 with HP- β -CD, respectively, because they have greater equilibrium constant and more negative ΔG values. This result may interact with the chemical structure of the molecule. Due to the capping effect from nitro or methoxy group, the molecule remains locked inside the cavity as reflected by the higher association constant value, as observed in the studies of Warner *et al.* On the contrary, complex formation between C20 drugs with native cyclodextrin and C14 with the modified one are the least favoured; in this case, both ABTs have the methyl group as R_2 substituent,

which may pass freely through the cavity forming weak links that result in a minor equilibrium constant.

Since ABTs have very low solubility in water, it was necessary to use a high concentration of DMSO (80%) to achieve an effective solvation of these molecules. It is well known that DMSO displays the capacity to form hydrogen bonds with water molecules and with $-OH$ groups from cyclodextrins, in addition to strong hydrophobic interactions with non-polar molecules [29–31]. So, it is logical to assume that ABTs will have a high affinity for the co-solvent, which will directly impact the complexation energy. Thereby, the effect of desolvation requires more energy (increase in the endothermic contribution), such as it was observed in this research.

4. Conclusion

ABTs form inclusion complexes with β -CD and HP- β -CD. The process is spontaneous at 298 K; the most important contribution is entropy. ABTs did not show a preference for any of the two main functional groups to form inclusion complexes with β -CD or HP- β -CD. Benzenesulfonamide's phenyl group as well as benzothiazole can penetrate cyclodextrin's hydrophobic cavity (Fig. 4), depending on the molecule's substituent.

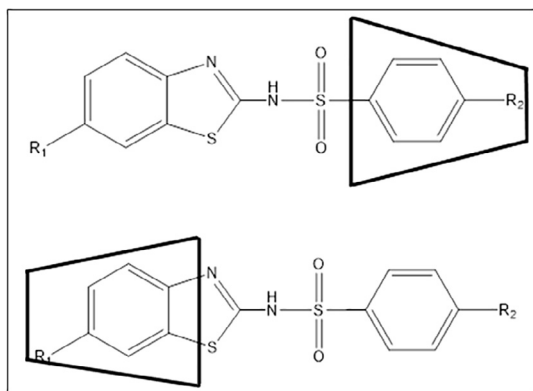


Fig. 4. Schematic diagram of the inclusion complex (1:1) of ABTs with CD.

The most stable complexes have methoxide and nitro substituents whose possibility of being anchored to one of cyclodextrin's rim favors host interactions and, because of their size, they fit better in the cavity. Desolvation of the host and interactions between the OH of the cyclodextrin and ABTs molecules, by hydrogen bond, can take place and contribute to stabilize this complexes. The steric hindrance with too bulky substituents can limit encapsulation.

These results prove that cyclodextrins can be used as viable molecular carriers for new drugs with low solubility antidiabetic properties. Further studies on the biological activity of formed complexes must still be done.

Acknowledgments

The present work was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT J49811Q), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (PAPIIT IN105107), and Facultad de Química, UNAM (PAIP 3290-09). We are grateful to Rafael Ibarra for his help provided in the language revision, Dra. María de los Ángeles Olvera Treviño for her support in calculating uncertainties and for sharing atmospheric pressure data and Dr. David Atahualpa Contreras for his help in NMR analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.09.013>.

References

- [1] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, *Diabetes Care* 27 (2004) 1047–1053, <https://doi.org/10.2337/diacare.27.5.1047>.

- [2] P. Alberts, L. Engblom, N. Edling, M. Forsgren, G. Klingström, C. Larsson, Y. Rönquist-Nii, B. Öhman, L. Abrahamssén, *Diabetologia* 45 (2002) 1528–1532, <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0959-6>.
- [3] G. Navarrete-Vazquez, P. Paoli, I. León-Rivera, R. Villalobos-Molina, J. Medina-Franco, R. Ortiz-Andrade, S. Estrada-Soto, G. Camici, D. Diaz-Coutiño, I. Gallardo-Ortiz, K. Martínez-Mayorga, H. Moreno-Díaz, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 3332–3341, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.042>.
- [4] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2045–2076.
- [5] R. Hedges, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2035–2044.
- [6] T.A. Sonia, C.P. Sharma, *Drug Discovery Today* 17 (2012) 784–792, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.019>.
- [7] S.K. Garg, J.S. Skyler, *Int. J. Clin. Pract.* 66 (2012) 85–93, <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02859.x>.
- [8] L. Zhang, Z. Zhenhai, N. Li, N. Wang, Y. Wang, S. Tang, L. Xu, Y. Ren, *Int. J. Biol. Macromol.* 61 (2013) 494–500, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.034>.
- [9] X. Zhu, W. Shan, P. Zhang, Y. Jin, S. Guan, T. Fan, Y. Yang, Z. Zhou, Y. Huang, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 317–328, <https://doi.org/10.1021/mp400493b>.
- [10] H. Aldawasari, A. Altaf, Z. Banjar, M. Okubo, D.I. Ohara, M. Anraku, F. Hirayama, K. Uekama, *J. Incl. Phenom. Macrocy. Chem.* 80 (2014) 61–67, <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0386-6>.
- [11] S. Sajeesh, K. Bouchemal, V. Marsaud, C. Vauthier, C.P. Sharma, *J. Control Release* 147 (2010) 377–384, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.007>.
- [12] F. Ungaro, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, C. Giovino, A. Miro, R. Sorrentino, F. Quaglia, M. Immacolata La Rotonda, *J. Control Release* 135 (2009) 25–34, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.12.011>.
- [13] K. Marsh, *Solution Calorimetry. IUPAC Commission on Thermodynamics, Blackwell Scientific Publications, UK*, 1994.
- [14] A. Vega-Rodríguez, Á. Piñeiro, S. Perez-Casas, *Thermochimica Acta* 405 (2003) 109–115, [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00132-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00132-1).
- [15] T. Shikata, R. Takahashi, T. Onji, Y. Satokawa, A. Harada, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 18112–18114, <https://doi.org/10.1021/jp0645667>.
- [16] B. Gidwani, A. Vyas, *BioMed. Res. Int.* (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/198268>.
- [17] D. Kumar, Y. Krishnan, M. Paranjothy, S. Pal, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 2864–2872, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11704>.
- [18] M. Eftink, R. Biltonen, *Biological Microcalorimetry*, Academic Press Inc, London, 1980, p. 343.
- [19] E. Alvarez-Lopez, S. Perez-Casas, *J. Chem. Thermodyn.* 67 (2013) 197–202, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2013.08.009>.
- [20] M. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1875–1917, <https://doi.org/10.1021/cr970015o>.
- [21] L. Liu, G. Qing-Xiang, *J. Inclusion Phenomena* 42 (2002) 1–14, <https://doi.org/10.1023/A:1014520830813>.
- [22] I.V. Terekova, *Thermochimica Acta* 526 (2011) 118–121, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.09.003>.
- [23] K. Uekama, F. Hirayama, M. Otagiri, Y. Otagiri, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.* 26 (1978) 1162–1167, <https://doi.org/10.1248/cpb.26.1162>.
- [24] J. Dey, E.L. Roberts, I.M. Warner, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 301–305, <https://doi.org/10.1021/jp971226o>.
- [25] A.F. Danil de Namor, D.A. Pacheco Tanaka, L. Nuñez Regueira, I. Gomez Orellana, *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 88 (1992) 1665–1668, <https://doi.org/10.1039/FT9928801665>.
- [26] A. Pal, R. Gaba, S. Soni, *J. Chem. Thermodyn.* 119 (2018) 102–113, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.12.017>.
- [27] R. Rajamohan, S. Kothai Nayaki, M. Swaminathan, *Spectrochimica Acta Part A* 69 (2008) 371–377, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.04.008>.
- [28] L. Liu, G. Qing-Xiang, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 3461–3467, <https://doi.org/10.1021/jp984545f>.
- [29] S. Belica, M. Sadowska, A. Stepniak, A. Graca, B. Pałecz, *J. Chem. Thermodyn.* 69 (2014) 112–117, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2013.10.004>.
- [30] S. Daschakraborty, *J. Chem. Phys.* 148 (2018), <https://doi.org/10.1063/1.5019239> 134501.
- [31] T. Shikata, R. Takahashi, T. Onji, Y. Satokawa, A. Harada, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006), <https://doi.org/10.1021/jp0645667>.